

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal)



**ACCIÓN DE LECTINAS FÚNGICAS SOBRE LA
ESTABILIDAD DEL CLOROPLASTO Y EL
RECONOCIMIENTO DE FOTOBIONTES DE
LÍQUENES.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Mara Sacristán San Cristobal

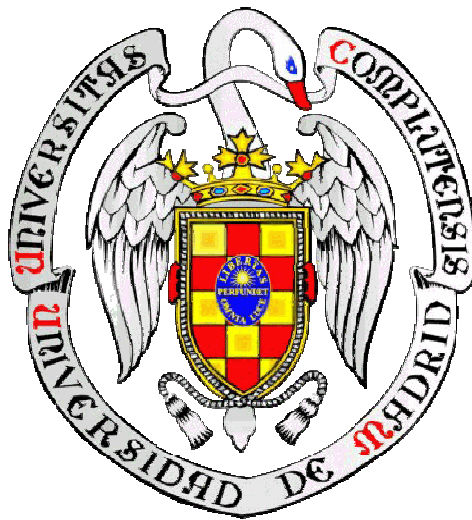
Bajo la dirección del doctor

Carlos Vicente Córdoba

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-3192-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I
(FISIOLOGÍA VEGETAL)



ACCIÓN DE LECTINAS FÚNGICAS SOBRE LA ESTABILIDAD
DEL CLOROPLASTO Y EL RECONOCIMIENTO DE
FOTOBIONTES DE LÍQUENES

TESIS DOCTORAL

MARA SACRISTÁN SAN CRISTÓBAL

MADRID, 2009

MARA SACRISTÁN SAN CRISTÓBAL

**ACCIÓN DE LECTINAS FÚNGICAS SOBRE LA ESTABILIDAD
DEL CLOROPLASTO Y EL RECONOCIMIENTO DE
FOTOBIONTES DE LÍQUENES**

Director

Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba

Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Vegetal I

(Fisiología Vegetal)

Madrid, 2009

Trabajo realizado en la Cátedra de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal I de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, que se presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 30 de Junio de 2009

Fdo. : Mara Sacristán San Cristóbal

Conforme, el director de Tesis

Fdo.: Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba

El presente trabajo es fruto de un gran esfuerzo en el que han contribuido muchas personas ayudándome y a las que quisiera expresar mi gratitud.

El Prof. Dr. D. Carlos Vicente Córdoba, Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, ha sido el director de esta Tesis Doctoral. De él nacieron las ideas para emprender este camino, consecuencia de un altísimo número de trabajos de investigación realizados durante toda su vida y que, lejos de cerrar un capítulo, han dejado nuevas líneas abiertas. Es una fuente inacabable de pensamiento que hace posible el progreso de la ciencia, arrastrando consigo a un numerosísimo grupo de personas a las que se encarga de formar diariamente y que acaba transformando en grandes profesionales. Si desde estas líneas se me permite hacer una petición diré que hay personas a las que este mundo debe estar agradecido por la gran labor realizada con su trabajo y por la entera dedicación al avance científico. De forma individual, éste es mi pequeño homenaje a esta gran persona con la que he tenido el honor de trabajar y de la que me siento orgullosa cada día. Gracias Carlos.

Este trabajo no podría haber sido posible sin la participación de la Prof. Dra. D^a María Estrella Legaz González, Catedrática de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Su apoyo incondicional y el vivo ejemplo de su persona me han animado a diario a tener fuerzas para desarrollar, tanto el trabajo experimental como la escritura de esta Tesis. Cada día ha sido capaz de enseñarme algo y es un referente profesional para los que respetamos y amamos el mundo docente e investigador. Es una trabajadora sin fin y una fuente inagotable de energía que ha dedicado y dedica su vida a la ciencia y a la formación de nuevos científicos. Gracias Estrella.

Hay veces que la vida se porta bien contigo y coloca en tu camino personas que la cambian, mucho y a mejor. No cabe en mi imaginación cómo hubieran sido estos años sin vosotros. Vuestra calidad humana es inigualable, gracias por haberme acogido en vuestro grupo y en vuestras vidas, por enseñarme, por guiarme, por hacerme reír y por quererme.

La realización de esta Tesis Doctoral ha contado con la colaboración de varios profesionales que no quisiera olvidar como son la Prof. Dra. D^a María Teresa Solas de la Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda con los cortes histológicos y la Microscopía Electrónica de Transmisión; la Prof. Dra. D^a Elfriede Stöcker-Worgöter y el Prof. Dr. D. Roman Türk de la Universidad de Salzburgo (Austria), por acogerme en su centro de trabajo y brindarme la oportunidad de conocer otra forma de trabajar en otro idioma y otro país diferente; la Prof. Dra. D^a Beata Guzow-Kręminska de la Universidad de Gdansk (Polonia) y el Dr. D. Georg Brunauer de la Universidad de Salzburgo (Austria), por enseñarme nuevas técnicas de trabajo en el campo de la Biología Molecular, por haber sido

piezas clave de un novedoso trabajo de investigación y por haberos convertido en mis amigos pese a la distancia.

También son parte de este trabajo mis compañeras y compañeros de laboratorio Rocío, María, Eva, Borja, Julia, Mercedes, Ana, Blanca y Yolanda con los que he compartido muy buenos momentos y me han ayudado en incontables ocasiones. Merece una mención especial el Prof. Dr. D. Roberto de Armas, por sus valiosos consejos en el laboratorio y por la preocupación y el interés por mi trabajo. Gracias a todos vosotros.

No tiene precio el sacrificio que ha supuesto para mis padres darme una buena educación, son los mejores padres que una persona pueda tener. Junto con mis hermanos Henar, Gustavo e Iván formáis la familia que me ha visto nacer y con la que he crecido. Sé que su cariño y su apoyo me van a acompañar siempre, sabed que yo también os quiero. Si por algo puedo considerarme una persona afortunada es por mi familia y mis amigos. Estos últimos son protagonistas de muchos de los mejores momentos de mi vida: Sandra, Roberto, Sonia, Mamen, Bea, Raúl, Gema, Archi, Mariví, Alberto, Maribel, David "Afflelou", Olaya, David "Pipi" y Bárbara. Gracias por aceptarme como soy.

No es fácil tomar la decisión de realizar una Tesis Doctoral, es un trabajo duro y largo que pone a prueba tus capacidades tanto académicas como personales. Este trabajo también es tuyo Javi, has luchado junto a mí a diario para conseguirlo dándome tu apoyo incondicional y aguantando todo lo que te ha venido encima con una sonrisa y mucho amor. Gracias por no dejarme caer, sé que no lo vas a hacer nunca. Gracias por hacerme feliz.

A todos vosotros, gracias de corazón.

ABREVIATURAS

ABP	Algal Binding Protein
ADC	Arginina Descarboxilasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosómico
AMP	Adenosín Monofosfato
Amp ^R	Gen de resistencia al antibiótico Ampicilina
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín Trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BN-PAGE	Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis
BSA	Bovine Serum Albumin
Chl	Clorofila
ConA	Concanavalina A, lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
CTAB	Bromuro de Cetil Trimetil Amonio
CTP	Citosín Trifosfato
DAP	Diaminopropano
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DFMA	DL- α -difluorometilarginina
DFMO	DL- α -difluorometilornitina
DLS	Dynamic Light Scattering
EC	Electroforesis Capilar
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FGAR	Formilglicinamida Ribonucleótido
FGAM	Formilglicinamidina Ribonucleótido
GAT	Dominio para la transferencia del grupo amido de la glutamina
GATasas	Glutamino Amidotransferasas
GMP	Guanosín Monofosfato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etansulfónico
HIF	Hormogonium Inducing Factor
HRF	Hormogonium Repressing Factor
IGP	Imidazol Glicerol Fosfato
ITCF	Isotiocianato de Fluoresceína
K _i	Constante de Inhibición
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Lysogeny Broth
LHCP	Light Harvesting Chlorophyll Protein
P ₆₈₀	Pigmentos asociados al fotosistema II cuyo máximo de absorción se encuentra a 680nm
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis

pl	Punto Isoeléctrico
NADP	Nicotiamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NB	Narrow Band
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PATAg	Ácido Peryódico-Tiocarbohidrazida de Plata
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH-PUT	Putrescina conjugada insoluble en ácido
PRFAR	N ¹ -(5'-fosforibosil)-formimino-5-aminoimidazol-4-carboxamida Ribonucleótido
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PUT	Putrescina
PVPP	Polivinilpirrolidona
S-PUT	Putrescina libre
SAE	Arginasa Segregable de <i>Evernia prunastri</i>
SAX	Arginasa Segregable de <i>Xanthoria parietina</i>
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SE-HPLC	Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography
SH-PUT	Putrescina conjugada soluble en ácido
SPD	Espermidina
SPM	Espermina
SSU	Small Subunit
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCA	Ácido Tricloroacético
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1-,2-diaminometano
TPK ⁺	Tampón Fosfato Potásico
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
UTP	Uridín Trifosfato
XMP	Xantosín Monofosfato

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES DE LA SIMBIOSIS LIQUÉNICA	4
1.1. Morfología y fisiología del talo liquénico	5
1.2. Síntesis de compuestos secundarios.....	9
1.3. Regulación del metabolismo de L-arginina dirigido hacia la síntesis de poliaminas en <i>E. prunastri</i>	10
1.4. Regulación de la población del fotobionte	12
2. LECTINAS LIQUÉNICAS	13
2.1. Naturaleza, fuentes y funciones de las lectinas	14
2.2. Las lectinas de los líquenes son glicoproteínas fúngicas	15
2.3. Otras proteínas de pared celular del micobionte en la zona de contacto con las células del alga.....	17
3. EL RECONOCIMIENTO ALGA-HONGO DEBE SER UN PROCESO CONTINUO	18
4. MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE RECONOCIMIENTO DE BIONTES QUE POSEEN RECEPTORES ESPECÍFICOS PARA LECTINAS	19
4.1. Especificidad por un azúcar	19
4.2. Las lectinas desarrollan actividades enzimáticas adicionales a su actividad aglutinante.....	19
4.3. Naturaleza del ligando de la lectina	22
5. LOS LÍQUENES PUEDEN PRODUCIR ISOFORMAS DE ARGINASAS GLICOSILADAS CON CARÁCTER DE LECTINAS	23
6. BASES BIOQUÍMICAS Y ULTRASTRUCTURALES DE LAS ALGAS INCOMPATIBLES	25
6.1. Bases estructurales de la incompatibilidad	25
6.2. Bases metabólicas de la incompatibilidad	27
7. LAS ALGAS INCOMPATIBLES SON ELIMINADAS MEDIANTE UN PROCESO DE MUERTE INDUCIDA	29
8. A MODO DE PREDEFINICIÓN DE UN ALGA COMPATIBLE	33
9. ESTABILIDAD DEL CLOROPLASTO	35

10. MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO EN CIANOLÍQUENES.....	37
11. LAS PAREDES CELULARES DE LAS ALGAS LIQUENIZADAS CONTIENEN MÚLTIPLES LIGANDOS PARA DIFERENTES LECTINAS.....	39
12. EXTENSIÓN DEL MODELO DE RECONOCIMIENTO MEDIANTE HERRAMIENTAS MOLECULARES.....	41
13. SIMBIOSIS LIQUÉNICA: ¿MUTUALISMO O PARASITISMO ATENUADO?	45
OBJETIVOS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. MATERIAL BIOLÓGICO	55
1.1. Clorolíquenes	55
1.2. Cianolíquenes	56
2. AISLAMIENTO DE LOS FOTOBIONTES.....	57
2.1. Aislamiento de clorobiontes de <i>E. prunastri</i>	57
2.2. Aislamiento de cianobiontes de <i>L. corniculatum</i>	60
3. LOCALIZACIÓN CITOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD UREASA EN PAREDES DEL FOTOBIONTE.....	60
3.1. Reacción citoquímica ureasa.....	60
3.2. Detección de la actividad ureasa y observación por Microscopía Óptica	61
4. ACTIVIDAD UREASA.....	61
4.1. Inducción de ureasa	61
4.2. Valoración de la actividad ureasa	62
4.3. Valoración de proteínas.....	62
5. ACTIVIDAD ARGINASA.....	63
5.1. Inducción de la arginasa segregable en <i>E. prunastri</i>	63
5.2. Inducción de la arginasa segregable en <i>L. corniculatum</i>	63
5.3. Aislamiento de la arginasa segregable de <i>L. corniculatum</i> por cromatografía de afinidad.....	64
5.4. Obtención de la arginasa talina de <i>L. corniculatum</i>	66
5.5. Valoración de la actividad arginasa.....	66
6. EFECTOS DEL FRIO Y EL FOTOPERIODO SOBRE TALOS DE <i>E. prunastri</i>	68
6.1. Simulación de condiciones invernales	68
6.2. Cortes histológicos	68

6.3. Preparación de las muestras para TEM.....	69
6.3.1. Fijación	69
6.3.2. Deshidratación.....	69
6.3.3. Obtención de cortes y tinción	70
7. ENSAYOS DE LIGAMIENTO DE LA LECTINA FÚNGICA SOBRE LOS CLOROBIONTES	71
7.1. Modificaciones de la pared celular	71
7.1.1. Valoración de azúcares.....	73
7.1.2. Determinación de la concentración de galactosa.....	73
7.2. Unión de la lectina segregable a clorobiontes.....	74
7.2.1. Valoración de actividad arginasa en el interior celular.....	75
7.3. Unión de la lectina marcada con ITCF a clorobiontes	75
7.3.1. Marcaje de la lectina con ITCF.....	75
7.3.2. Medida de fluorescencia.....	76
7.3.3. Desorción de la lectina marcada unida a pared celular	76
7.3.4. Microscopía de Fluorescencia.....	77
8. ENSAYOS DE LIGAMIENTO DE LA LECTINA FÚNGICA SOBRE CIANOBIOTES Y CLOROBIONTES.....	77
9. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE LAS ALGAS Y DE SUS COMPLEJOS CLOROFILA-PROTEÍNA EN PRESENCIA DE PUTRESCINA Y LA LECTINA FÚNGICA.....	78
9.1. Medida de la capacidad fotosintética	79
9.2. Espectros de absorción y fluorescencia.....	80
9.3. Aislamiento de los complejos clorofila-proteína	81
9.3.1. Separación de los complejos clorofila-proteína por EC	81
9.3.1.1. Preparación de las muestras para EC.....	81
9.3.1.2. Acondicionamiento del capilar	82
9.3.1.3. Condiciones de separación por EC	82
9.3. 2. Separación de los complejos clorofila-proteína por SDS-PAGE..	84
9.3.2.1. Revelado de los geles.....	85
10. ESTUDIO MOLECULAR DE LA LECTINA FÚNGICA.....	86
10.1. Secuenciación de la arginasa	86
10.1.1. Purificación de la arginasa de <i>E. prunastri</i>	86
10.1.2. Purificación de la arginasa de <i>X. parietina</i>	87
10.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de	

SDS de ambas arginasas	87
10.1.4. Digestión enzimática y análisis de la secuencia	88
10.2. Oligonucleótido de arginasa.....	88
10.2.1. Extracción del ADN	89
10.2.2. Amplificación por PCR	90
10.2.2.1. Diseño de los cebadores.....	91
10.2.2.2. Combinaciones de los cebadores y gradientes de temperatura en la fase de Hibridación	94
10.2.2.3. PCR anidada	95
10.2.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	96
10.2.4. Clonaje de los productos de PCR	96
10.2.5. Limpieza de productos de PCR y Secuenciación	98
10.2.5.1. Extracción de bandas de geles de agarosa	99
RESULTADOS	101
1. DETECCIÓN CITOQUÍMICA DE UREASA DE CLOROBIONTES	103
2. LOS MÁXIMOS DE ACTIVIDAD DE ARGINASA Y UREASA NO COINCIDEN DURANTE EL AÑO	104
3. LAS BAJAS TEMPERATURAS Y LOS DÍAS CORTOS PRODUCEN LA APARICIÓN DE APLANOSPORANGIOS Y CÉLULAS JÓVENES DENTRO DEL TALO DE <i>E. prunastri</i>	106
3.1. Efectos del fotoperiodo.....	106
3.2. Efectos de la temperatura	108
4. LIGAMIENTO DE LA LECTINA A LA PARED DE LOS CLOROBIONTES	113
4.1. Valoración de la actividad enzimática arginasa	113
4.1.1. Valoración de azúcares liberados por la acción de las galactosidasas sobre la pared celular de los clorobiontes	114
4.1.2. Valoración de galactosa	115
4.2. Unión de la lectina marcada con ITCF a los clorobiontes.....	116
4.2.1. Fluorimetría	116
4.2.2. Microscopía de Fluorescencia.....	117
5. VALORACIÓN DE ARGINASA EN <i>L. corniculatum</i>	119
6. LA ARGINASA SEGREGABLE DE <i>L. corniculatum</i> RECONOCE LA UREASA POLIGALACTOSILADA COMO LIGANDO	121
6.1. Cromatografía de afinidad.....	121
6.2. Separación de proteínas eluidas por cromatografía de afinidad	

mediante PAGE-SDS	123
7. LA ARGINASA SEGREGABLE DE <i>L. corniculatum</i> RECONOCE CIANOBIOTES DE <i>Leptogium</i> ASÍ COMO A CLOROBIONES DE <i>Evernia</i>.....	125
8. EFECTOS DE LA LECTINA FÚNGICA Y LA PUTRESCINA SOBRE EL CLOROPLASTO DE LOS CLOROBIONES.....	128
8.1. Actividad Fotosintética (Reacción de Hill)	128
8.2. Espectros de Absorción	129
8.3. Espectros de Fluorescencia	135
8.4. Estudio de los complejos clorofila-proteína por Electroforesis Capilar	145
8.5. Estudio de los complejos clorofila-proteína por PAGE-SDS.....	159
9. COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA DE LA ARGINASA	161
9.1. Composición cuantitativa de los aminoácidos de SAE y SAX	161
9.2. Composición de azúcares de SAE y SAX.....	162
9.3. Fragmentos de la secuenciación de aminoácidos	163
10. OLIGONUCLEÓTIDO DE ARGINASA.....	163
10.1 Primera PCR en gradiente de temperatura.....	165
10.2. Segunda PCR en gradiente de temperatura.....	164
10.2.1. PCR del clonaje	167
10.2.2. Similitud del oligonucleótido con las proteínas publicadas en la base de datos	169
10.3. Tercera PCR en gradiente de temperatura.....	169
10.3.1. PCR del clonaje.....	170
10.3.2. Similitud del oligonucleótido con las proteínas publicadas en la base de datos	171
DISCUSIÓN.....	173
1. PRODUCCIÓN SINCRÓNICA DE LA LECTINA FÚNGICA, EL RECEPTOR DE LA LECTINA EN EL CLOROBIONTE, Y LA DIVISIÓN CELULAR DEL ALGA EN <i>Evernia prunastri</i>.....	175
2. NATURALEZA DEL ENLACE GLICOSÍDICO DEL RECEPTOR DE PARED DEL ALGA PARA LA LECTINA FÚNGICA	177
3. EL MODELO DE RECONOCIMIENTO CELULAR A TRAVÉS DE UNA LECTINA FÚNGICA Y SU LIGANDO EN EL ALGA PUEDE EXTENDERSE A CIANOLÍQUENES	180
4. ACCIÓN DE LA LECTINA FÚNGICA Y LA PUTRESCINA SOBRE LA ORGANIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS CLOROFILA-PROTEÍNA DEL CLOROBIONTE.....	182
5. SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LECTINAS LIQUÉNICAS.....	190

6. CONSTRUCCIÓN DE UN OLIGONUCLEÓTIDO MODELO DE ARGINASA	192
CONCLUSIONES	199
RESUME	205
CONCLUSIONS	211
BIBLIOGRAFÍA	217

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de una célula de <i>Trebouxia</i>	6
Figura 2. A) Esquema del talo líquénico. B) Intercambio de metabolitos entre el micobionte y el fotobionte en la zona de contacto o haustorio intraparietal.	7
Figura 3. Esquema de los tipos de talo líquénico. En el talo homómero ambos biontes están distribuidos uniformemente, y en el heterómero ocupan diferentes estratos.	9
Figura 4. La arginina en líquenes es rápidamente metabolizada tras la hidratación del talo produciendo putrescina, bien por una vía hidrolítica mediante arginasa produciendo ornitina y urea, o descarboxilativa vía agmatina. La arginasa es una enzima inducible por sustrato cuando el talo es incubado en oscuridad (Legaz y Vicente, 1980), aunque también es activa en luz.	11
Figura 5. Hipótesis de la Prof. Margalith Galun sobre el mecanismo de reconocimiento o discriminación entre simbiontes, basada en sus propios resultados experimentales trabajando con la lectina ABP de <i>Xanthoria parietina</i>	16
Fig. 6. Detección citoquímica de ureasa en paredes del clorobionte de <i>X. parietina</i> como depósitos de CoS densos a los electrones. A) Control incubado en tampón. B) Ampliación de la zona señalada en A. C) Control de clorobiontes incubados en CoCl ₂ sin urea. D) Ampliación de la zona recuadrada en C. E) Clorobiontes de <i>X. parietina</i> incubados en urea y CoCl ₂ . Tomado de Legaz <i>et al.</i> (2004).	20
Figura 7. Esquema de la base molecular del reconocimiento y discriminación celular entre alga y hongo basado en dos clases de lectinas producidas por el micobionte, las particuladas en pared y las solubles encargadas del reclutamiento de posibles algas compatibles.	22
Figura 8. Efectos de la lectina fúngica sobre clorobiontes aislados de <i>X. parietina</i> sin el ligando de pared inducido, células incompatibles. A) Amplificación de la zona periplásmica de dichos clorobiontes donde las vesículas secretoras (1, 2 y 3) conteniendo polisacáridos migran hacia el espacio apoplástico en un intento de reconstruir la estructura desorganizada de la pared. B) Esquema de la formación de vesículas secretoras desde la TGN en el Aparato de Golgi migrando hacia la pared celular de los clorobiontes para secretar macromoléculas sobre su cara interna. (cw= pared celular, pm= membrana plasmática, sb= cuerpos de almacenamiento, RE= Retículo Endoplásmico, TGN= Red Trans Golgi, AG= Aparato de Golgi, V1= vesículas jóvenes, V2= vesículas con membrana reorganizada, V3= vesículas con polisacáridos concentrados, V4= vesículas en exocitosis).	29

Figura 9. Esquema de la incompatibilidad entre simbioses. La actividad glucanasa se ve incrementada como consecuencia de la entrada de la lectina fúngica en el clorobionte vía hidrólisis de arginina y aumento de la concentración de putrescina en el interior celular.	31
Figura 10. Detalle por Microscopía Electrónica de Transmisión de la pérdida de material citoplásmico de clorobiontes de <i>X. parietina</i> a través de un poro producido por acción de glucanasas activadas por putrescina, último efecto de la entrada de la arginasa en el interior de una célula sin receptor de pared celular (tomada de Molina <i>et al.</i> , 1998b).	32
Figura 11. Esquema de la compatibilidad entre simbioses. La lectina fúngica es retenida en la superficie exterior celular del clorobionte compatible y por tanto hay ausencia de cambios estructurales o metabólicos.	34
Figura 12. Esquema del proceso de reconocimiento de cianobacterias por micobiontes compatibles, según Rinkinen (2002).	38
Figura 13. Esquema de las etapas de la PCR. (1) Desnaturalización: ADN molde en forma de cadena sencilla aplicando temperaturas de 90 a 95° C, lo que produce la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. (2) Hibridación: se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 a 60° C para que se pueda producir la unión de los cebadores (en rojo) a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. (3) Extensión: La polimerasa toma la cadena de ADN molde previamente desnaturalizado para sintetizar la cadena complementaria (en verde) incorporando los nucleótidos y parte del cebador como soporte inicial en extremo 3'. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser 72 +/- 5° C ya que es a este rango de temperatura en que la polimerasa alcanza su máxima actividad. (4) Elongación de todos los fragmentos formados a 72° C.	42
Figura 14. Mapa génico del plásmido pCR [®] 4-TOPO [®] en la que destacan dos genes que actúan como marcadores de selección: Amp ^R , gen de resistencia a la Ampicilina, y lacZ que codifica para la enzima β-galactosidasa, pero defectuoso en 3'. Dentro del gen lacZ se localizan las diferentes dianas de inserción en lo que se conoce como <i>polylinker</i> (región rica en diferentes dianas de restricción únicas). Así, en un experimento de clonación, cualquier inserto de ADN foráneo interrumpiría el gen lacZ del plásmido y la bacteria con plásmido recombinante carecería de función β-galactosidasa. Uno de los productos de degradación del X-gal forma un precipitado de color azul sobre las colonias bacterianas con función β-galactosidasa.	44
Figura 15. Ejemplar de <i>Evernia prunastri</i>	55
Figura 16. Ejemplar de <i>Xanthoria parietina</i>	56
Figura 17. Ejemplar de <i>Leptogium corniculatum</i>	57

Figura 18. Esquema del aislamiento de fotobiontes a partir de talos líquénicos.	58
Figura 19. Detalle de la interfase formada por algas entre el KI, parte inferior, y la sacarosa y el tampón fosfato, parte superior.....	59
Figura 20. Clorobiontes aislados a partir de <i>Evernia prunastri</i> , libres de hifas en tampón fosfato potásico.....	59
Figura 21. Esquema de la reacción citoquímica de la ureasa en presencia de cloruro de cobalto.	60
Figura 22. Esquema del aislamiento de la arginasa por cromatografía de afinidad mediante ureasa adsorbida sobre agarosa activada con bromuro de cianógeno.....	65
Figura 23. Esquema de la reacción de la arginasa incluyendo ureasa en la mezcla de reacción valorada en el Método de Conway.	66
Figura 24. Esquema del protocolo para la valoración de la actividad arginasa indicando el lugar de adición de cada reactivo en los recipientes de vidrio.	67
Figura 25. Representación esquemática de todo el protocolo de los ensayos de ligamiento de la lectina de <i>E. prunastri</i> sobre sus clorobiontes.....	72
Figura 26. Esquema de la reacción de oxidación la galactosa mediante la enzima galactosa oxidasa y acoplamiento de una peroxidación con guayacol para medir aparición de producto por colorimetría a 470 nm (D.O. del tetraguayacol).	74
Figura 27. Molécula de Isotiocianato de fluoresceína (ITCF).....	75
Figura 28. Molécula de DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), es un aceptor de electrones no fisiológico utilizado para medir el transporte de electrones en la fotosíntesis. En su forma oxidada es de color azul y absorbe a 600nm. Reducido es incoloro y no absorbe.....	79
Figura 29. Espectro de absorción de las clorofilas a y b. La clorofila a presenta dos máximos de absorción: 435 y 660 nm. La clorofila b presenta sus dos máximos de absorción a 450 y 640 nm respectivamente.	83
Figura 30. Esquema de la PCR anidada. (1) Desnaturalización. (2) Hibridación de los cebadores exteriores (en rojo). (3) Extensión. (4) Elongación. (5) Separación de las hebras del ADN molde e hibridación de los cebadores más internos (en negro). (6) Extensión. P= polimerasa.	95

Figura 31. Detección del ligando (ureasa) para la lectina fúngica en la pared celular de clorobiontes de *Evernia* como depósitos negros de CoS. (A) Control sin urea y (B) reacción con urea de algas aisladas de líquenes recolectados en Noviembre. (C) Control sin urea y (D) algas incubadas en urea de talos recolectados en Mayo. Bar = 5.0 μm 103

Figura 32. Secreción de Arginasa (A) y Ureasa (B) a lo largo del año a partir de talos incubados en tampón medida como actividad específica enzimática (unidad= 1 $\mu\text{mol NH}_4^+/\text{mg prot min}$). Los valores corresponden a la media de tres réplicas. Los errores estándar vienen representados por barras verticales. 105

Figura 33. Efectos de las condiciones fotoperiódicas sobre el tamaño de las algas visualizados en cortes histológicos de 8 μm de espesor por microscopía de campo claro. (A) y (B) Células control bajo 16 h de luz y 8 h de oscuridad. (C - F) Secciones de talos bajo 8 h de luz y 16 h de oscuridad. Las flechas indican aplanosporangios. Barras = 10 μm 107

Figura 34. Efecto de las condiciones fotoperiódicas sobre la frecuencia de distribución del tamaño en las células. (A) Frecuencia del tamaño de algas de talos sometidos a condiciones de día largo (16 h de luz, 8 h de oscuridad). Los valores son la media de 160 células de 6 talos diferentes. (B) Frecuencia del tamaño de clorobiontes de talos bajo condiciones de día corto (8h de luz, 16 h de oscuridad). Los valores son la media de 140 células aisladas de 5 talos diferentes. El error estándar nunca fue superior al 10 %. 108

Figura 35. Efecto de la temperatura sobre la frecuencia de la distribución celular según su tamaño visualizado bajo un invertomicroscopio en cortes histológicos de 8 μm de espesor. (A) y (B) Muestras almacenadas a temperatura ambiente. (C) y (D) Talos sometidos a bajas temperaturas, 24 h a -6 °C y 48 h a 5 °C. Las flechas rojas señalan aplanosporangios y las blancas indican células iniciando división. Barras = 20 μm en (A) y 10 μm desde (B) a (D). 109

Figura 36. Efecto de la temperatura sobre la frecuencia de distribución de las células según su tamaño. (A) Frecuencia del tamaño celular de talos almacenados a temperatura ambiente. Los valores son la media de 122 células de 5 talos diferentes. (B) Frecuencia del tamaño de algas procedentes de talos mantenidos a 5 °C durante 24 h y a -6 °C durante 48 h. Los valores son la media de 165 algas de 6 talos diferentes. El error estándar nunca superó el 10 %. 110

Figura 37. Microscopía electrónica de transmisión de talos de *E. prunastri* bajo temperatura ambiente. (A) Dos zonas de contacto diferentes entre el alga y el hongo, adhesión “pared con pared” (flecha roja), y puentes de mucílago (flecha blanca). (B) Haustorio intraparietal. (C) Uno de los pocos aplanosporangios observados en condiciones de temperatura ambiente. Hf = hifa fúngica; cf = célula del clorobionte; ca = cubierta del aplanosporangio. 111

Figura 38. Microscopía Electrónica de Transmisión de talos de *E. prunastri* sometidos a bajas temperaturas. (A) Aplanosporangio conteniendo cinco aplanosporas en el que algunas hifas contactan con las algas mediante adhesión “pared con pared” (flechas rojas).

Las hifas externas contactan con la superficie de la cubierta del aplanosporangio también mediante adhesión “pared con pared” (flecha blanca). (B) A veces, los haustorios intraparietales pueden ser vistos dentro del aplanosporangio (flecha negra). (C) y (D) Aplanosporas dividiéndose dentro del aplanosporangio. 112

Figura 39. Actividad arginasa después de la unión de la enzima al ligando de pared celular de clorobiontes incubados con distintas enzimas. (A) Unión a células que contienen el ligando de manera natural, talos recogidos en Noviembre. (B) Unión a células en las que se ha inducido el ligando experimentalmente mediante incubación con urea, talos recogidos en Mayo. Los valores son la media de tres réplicas. El error estándar nunca fue superior al 10 %. 114

Figura 40. Medida de la emisión de fluorescencia de la arginasa segregable de *E. prunastri* marcada con ITCF e incubada después con clorobiontes, aislados de talos con receptor de pared naturalmente inducido, sometidos a distintas pruebas experimentales. 117

Figura 41. Unión de la lectina marcada con ITCF a clorobiontes observados bajo irradiación con luz azul. (A) Control sin incubación con la arginasa marcada. (B) Clorobiontes de talos recolectados en Noviembre tratados con arginasa marcada. (C) Clorobiontes de talos recogidos en Mayo, incubados previamente en urea y tratados con arginasa marcada. (D) Las mismas células que en B tratadas con α -galactosidasa e incubadas después con arginasa marcada. (E) Las mismas células que en C tratadas con α -galactosidasa e incubadas después con arginasa marcada. (F) Las mismas células que en B tratadas con β -galactosidasa e incubadas después con arginasa marcada. (G) Las mismas células que en C tratadas con β -galactosidasa e incubadas después con arginasa marcada. Barras= 5,0 μ m. 118

Figura 42. Valoración de la actividad específica de arginasa segregable (A) e intracelular (B) en talos de *L. corniculatum* previamente incubados en tampón solamente (azul), o en tampón conteniendo arginina (verde) frente al tiempo. Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar. 120

Figura 43. Valoración de la concentración de proteína (A) y de la actividad arginasa (B) en las fracciones de elución de la arginasa de *L. corniculatum* sobre lechos de agarosa activada con bromuro de cianógeno con ureasa de *E. prunastri* adsorbida. 122

Figura 44. Gel de la electroforesis en poliácridamida-SDS de las fracciones de la cromatografía de afinidad. Calle 1: Fracción 5 de la columna eluida con tampón con Galactosa. Calle 2: Fracción 4 eluida con tampón. Calle 3: Fracción 4 eluida con tampón-Galactosa. Calle 4: Medio de incubación de *Leptogium* sin pasar por columna. Calle 5: Marcadores Moleculares (kDa). Calle 6: Fracción 11 eluida con tampón. Calle 7: Fracción 11 eluida con tampón – Galactosa. Calle 8: Fracción 7 eluida con tampón. Calle 9: Fracción 7 eluida con tampón-Galactosa. 123

Figura 45. Representación gráfica del logaritmo de las masas moleculares de los patrones de proteínas utilizados en la PAGE-SDS, frente a la movilidad electroforética de las mismas en cm y ajuste de los puntos por regresión lineal.	124
Figura 46. Talo de <i>Leptogium corniculatum</i> al microscopio óptico de campo claro y fluorescencia. (A) Sección transversal del talo de <i>Leptogium corniculatum</i> bajo luz azul mostrando la autofluorescencia roja de las clorofilas fotoexcitadas de células de <i>Nostoc</i> formando pseudofilamentos pero nunca heterocistos. (B) Esquema del talo de un cianoliquen (<i>Euloleptogium</i>). (C) Sección transversal del talo homómero de <i>Leptogium</i> realizada con un microtomo de congelación y teñido con lactofenol azul de algodón.	125
Figura 47. Unión de la arginasa marcada con ITCF a los cianobiontes de <i>L. corniculatum</i> . (A) Sección del talo de <i>L. corniculatum</i> bajo el microscopio de campo claro y (B) bajo el de fluorescencia. (C) Cianobiontes recién aislados observados con microscopía óptica y (D) con microscopía de fluorescencia. (E) y (F) Cianobiontes tras 1 h en contacto con una solución de la lectina segregada de <i>L. corniculatum</i> marcada con ITCF ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) bajo luz azul del microscopio de fluorescencia.	126
Figura 48. Unión de la arginasa segregable de <i>L. corniculatum</i> marcada con ITCF a los clorobiontes de <i>E. prunastri</i> . (A) Células de <i>Evernia</i> sin ningún tratamiento. (B) Células de <i>Evernia</i> después de 1 h en contacto con una solución de arginasa marcada de <i>L. corniculatum</i> observadas bajo la luz azul del microscopio de fluorescencia.	127
Figura 49. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas control.	134
Figura 50. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en una solución de PUT 5 mM.	134
Figura 51. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en una solución de PUT 7 mM.	135
Figura 52. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en una solución de urea 40 mM.	135
Figura 53. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en la lectina fúngica.	136
Figura 54. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en urea 40 mM y arginasa.	136
Figura 55. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en urea 40 mM, α -1,4-galactosidasa y arginasa.	137

Figura 56. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas control.....	138
Figura 57. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas en PUT 5mM.	138
Figura 58. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas en PUT 7mM.	138
Figura 59. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas con urea.	139
Figura 60. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas con arginasa.....	139
Figura 61. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas con urea y arginasa.....	139
Figura 62. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas con urea, α -1,4-galactosidasa y arginasa.	139
Figura 63. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de las algas control.....	140
Figura 64. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de algas incubadas en PUT 5 mM.	140
Figura 65. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de algas incubadas en PUT 7 mM.	140
Figura 66. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de las algas incubadas con urea.	141
Figura 67. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de las algas incubadas con arginasa.....	141
Figura 68. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de las algas incubadas con urea y arginasa.....	141
Figura 69. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de las algas incubadas con urea, α -1,4-galactosidasa y arginasa.	141

Figura 70. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 715 nm de algas control.	142
Figura 71. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm λ con de emisión 715 nm de algas incubadas en PUT 5mM.	142
Figura 72. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm λ con de emisión 715 nm de algas incubadas en PUT 7mM.	142
Figura 73. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm λ con de emisión 715 nm de algas incubadas en urea.	143
Figura 74. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm λ con de emisión 715 nm de algas incubadas en arginasa.	143
Figura 75. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm λ con de emisión 715 nm de algas incubadas en urea y arginasa.	143
Figura 76. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm λ con de emisión 715 nm de algas incubadas con urea, α -1,4-galactosidasa y arginasa.	143
Figura 77. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas control con detección a 280 nm.	147
Figura 78. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas control con detección a 435 nm.	148
Figura 79. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas con Putrescina 5 mM con detección a 280 nm.	149
Figura 80. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas con Putrescina 5 mM con detección a 435 nm.	149
Figura 81. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas con Putrescina 7 mM con detección a 280 nm.	150
Figura 82. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas con Putrescina 7 mM con detección a 435 nm.	151
Figura 83. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM con detección a 280 nm.	151
Figura 84. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM con detección a 435 nm.	152

Figura 85. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en arginasa con detección a 280 nm.	153
Figura 86. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en arginasa con detección a 435 nm.	153
Figura 87. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM y después en arginasa fúngica con detección a 280 nm.	154
Figura 88. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM y después en arginasa fúngica con detección a 435 nm.	155
Figura 89. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM, α -galactosidasa (5u mL ⁻¹) y arginasa con detección a 280 nm.	156
Figura 90. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM, α -galactosidasa (5u mL ⁻¹) y arginasa con detección a 435 nm.	156
Figura 91. Gel de la electroforesis en poliacrilamida-SDS de los complejos clorofila-proteína aislados de algas de <i>E. prunastri</i> . Calle 1: Complejos aislados de algas incubadas con urea 40 mM. Calle 2: Complejos de algas incubadas en arginasa talina. Calle 3: Complejos de algas tratadas con urea 40 mM y después con arginasa. Calle 4: Complejos de algas incubadas en urea 40 mM, α -galactosidasa y arginasa. Calle 5: Marcadores Moleculares (kDa). Calle 6: Complejos clorofila-proteína control. Calle 8: Marcadores Moleculares (kDa). Calle 9: Complejos aislados de algas incubadas en PUT 5 mM. Calle 10: Complejos aislados de algas incubadas en PUT 7 mM.	157
Figura 92. Representación gráfica del logaritmo de las masas moleculares de los patrones de proteínas utilizados en la PAGE-SDS, frente a la movilidad electroforética de las mismas en cm y ajuste de los puntos por regresión lineal.	158
Figura 93. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de SAE (A) mostrando una banda de 22 kDa aproximadamente, y SAX (B) con otra banda sobre 54 kDa, previamente dializadas frente a tampón Tris-HCl pH 9,1. En paralelo a las muestras de arginasas, también se corrieron en los geles dos cantidades diferentes de albúmina de suero bovino (BSA) como control, así como la mezcla de marcadores moleculares (Mw).	161
Figura 94. (A) Huella peptídica de SAE. El pico seleccionado para ser secuenciado fue el de 1224,62 Da. (B) Huella peptídica de SAX. El pico seleccionado para secuenciación fue el de 1479,78 Da.	162
Figura 95. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR en gradiente de temperatura. Se representa en cada temperatura la amplificación de cada material genético,	

L. muralis en las 4 primeras calles y *X. parietina* en las 4 siguientes. Los números del 1 al 4 corresponden a cada una de las combinaciones de cebadores. Los productos de PCR más puros fueron aquellos cuya temperatura de hibridación fue 55° C ó 54° C, como se observa en las bandas teñidas de bromuro de etidio bajo la luz UV. Mw= Marcador molecular en pares de bases (pb). 163

Figura 96. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR en gradiente de temperatura con el ADN de *L. muralis* como ADN molde y con las combinaciones de cebadores 2 y 4 (For1/ Rev1 y For2/ Rev1, respectivamente). La flecha roja indica el amplicón elegido para el clonaje en células competentes de *E. coli*. Mw= Marcador molecular en pares de bases (pb). 164

Figura 97. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR del clonaje. Las bandas pertenecen a los materiales génicos amplificados por los cebadores M13 (*forward* y *reverse*) insertados en el plásmido con el que se transformaron las bacterias. 166

Figura 98. Marcadores moleculares utilizados en la electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de la PCR del clonaje. Las bandas señaladas en rojo son las que se encuentran más marcadas que el resto en los geles. 166

Figura 99. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR en gradiente de ocho temperaturas de hibridación (55° C, 54,6° C, 54° C, 53° C, 51,7° C, 50,9° C, 50,3° C y 50° C) realizada con las cuatro combinaciones de cebadores y la Go Taq ADN polimerasa. En la sucesión de temperaturas se observa cómo a mayor temperatura, la especificidad de unión de los cebadores al ADN molde es mayor, es decir, el número de bandas es menor. Mw= el Marcador molecular empleado en este caso fue GeneRuler™ y O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladders (100-3000 pb). 168

Figura 100. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR del clonaje. Mw= Marcador molecular con un rango entre 100 y 3000 pb. 169

Figura 101. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR del clonaje tras haber sido sometidos al protocolo de limpieza de productos de PCR necesario su secuenciación. Mw= Marcador molecular con un rango entre 100 y 3000 pb. 169

Figura 102. Esquema del reconocimiento lectina-ligando a nivel de la pared celular del alga. La parte peptídica de la arginasa fúngica reconoce el resto de azucarado de la ureasa de pared formado por restos de α -D-galactosa en uniones 1,4. 179

Figura 103. Reconocimiento de la lectina fúngica con actividad arginasa del clorobionte compatible. La lectina es retenida en la superficie de la pared celular mediante una reacción de afinidad entre la glicoproteína y su ligando de pared, una ureasa poligalactosilada sintetizada por los clorobiontes compatibles. La concentración de putrescina en el alga permanece sin cambios al igual que el cloroplasto y la pared celular. 189

Figura 104. Discriminación de algas incompatibles mediante una lectina fúngica con actividad arginasa. La ausencia del receptor específico adecuado (ligando) sobre la pared celular facilita la entrada de la lectina en la célula, provocando un aumento en la concentración de putrescina, la cual desorganiza el cloroplasto y activa glucanasas que hidrolizan la pared celular y liberan el protoplasto del alga.....	190
Figura 105. Residuos conservados del sitio GAT de varias GATasas (Mouilleron y Golinelli-Pimpaneau, 2007).	193
Figura 106. A) Hidrólisis del grupo amido de la glutamina mediado por GAT (Glutamino Aminotransferasa) dando como productos glutamato y amoniaco. B) Acción de la arginasa sobre la arginina rindiendo ornitina y urea.	194
Figura 107. Biosíntesis de los aminoácidos ornitina y prolina con glutamato como precursor (Berg <i>et al.</i> , 2008).	195
Figura 108. El grupo carbaminilo del carbamifosfato, que tiene un elevado potencial de transferencia debido a su enlace anhídrido, se transfiere a la ornitina para formar citrulina en un reacción catalizada por la ornitina transcarbamilasa. La citrulina se condensa con aspartato por la arginosuccinato sintasa, la síntesis de arginosuccinato está favorecida por la ruptura del ATP en AMP y pirofosfato, y la consiguiente hidrólisis del pirofosfato. La argininsuccinasa escinde el argininsuccinato en arginina y fumarato (Berg <i>et al.</i> , 2008).	196
Figura 109. Degradación de la arginina catalizada por la arginasa (Berg <i>et al.</i> , 2008).	196

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Algas liquenizadas.....	3
Tabla II. Hongos liquenizados.	4
Tabla III. Algunas propiedades bioquímicas de las cuatro isoformas de la arginasa de <i>Evernia prunastri</i> que se corresponden con los estados de agregación de la enzima.....	25
Tabla IV. Medida de la cantidad de azúcares totales liberados al medio por clorobiontes de <i>Evernia</i> en dos estados fisiológicos distintos (con o sin receptor de pared) tratados con α - y β -galactosidasa. Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar.....	115
Tabla V. Medida de la cantidad de galactosa liberada al medio por clorobiontes de <i>Evernia</i> en dos estados fisiológicos distintos (con o sin receptor de pared) tratados con α - y β -galactosidasa. Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar.....	116
Tabla VI. Valores de la suma de las concentraciones de las clorofilas a y b en $\mu\text{g mL}^{-1}$, velocidad de reacción en unidades de absorbancia por minuto y actividad del fotosistema II en $\text{UA mL min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de los extractos de clorofilas de los clorobiontes.	128
Tabla VII. Valores de Absorbancia (UA) de cada uno los máximos más representativos de los espectros de absorción de los extractos clorofílicos de las algas de <i>E. prunastri</i> según los distintos tratamientos	134
Tabla VIII. Emisión de Fluorescencia entre 600 y 800 nm con una λ de excitación de 440 nm para cada uno de los tratamientos de las algas.....	138
Tabla IX. Fluorescencia de los distintos extractos clorofílicos de las algas aisladas de <i>E. prunastri</i> , según los tratamientos correspondientes, a los distintos máximos de excitación provocados por una λ de emisión de 680 nm.	141
Tabla X. Fluorescencia de los distintos extractos clorofílicos de las algas aisladas de <i>E. prunastri</i> , según los tratamientos correspondientes, a los distintos máximos de excitación provocados por una λ de emisión de 715 nm.	144
Tabla XI. Tiempos de retención en minutos y movilidades electroforéticas en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$, de cada uno de los picos de los electroferogramas correspondientes a las muestras de complejos clorofila-proteína obtenidas a partir de algas aisladas de talos de <i>E. prunastri</i> y tratadas con concentraciones crecientes de putrescina (5mM y 7mM) y su correspondiente control.	146

Tabla XII. Tiempos de retención en minutos y movilidades electroforéticas en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$, de cada uno de los picos de los electroferogramas correspondientes a los complejos clorofila-proteína obtenidos a partir de algas aisladas de talos de *E. prunastri*, tratadas con urea 40 mM, arginasa, urea 40 mM y arginasa, y por último, urea, α -galactosidasa y arginasa. 147

Tabla XIII. Composición cuantitativa de aminoácidos en mol mol^{-1} de ambas arginasas, SAE y SAX según Legaz *et al.* (2001) y Molina y Vicente (2000), respectivamente. 162

Tabla XIV. Residuos monosacáridicos por molécula de las arginasas segregables purificadas a partir de talos de *E. prunastri* y *X. parietina*. 162

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son asociaciones simbióticas íntimas y establecidas a largo plazo de un alga o cianobacteria fotosintética y un hongo heterótrofo que se unen para formar una nueva entidad biológica diferente de sus componentes individuales (Galun y Kardish, 1995). Algunos líquenes están formados por los tres tipos de organismos (Ahmadjian, 1993). Se conocen entre 13.000 y 17.000 especies, presentes en todo el planeta, de las cuales sólo el 10-15 % tienen cianobacterias como fotobiontes. Taxonómicamente, toman nombre de la parte fúngica, que es lo que caracteriza al organismo completo, puesto que sólo existen unos 100 fotobiontes distintos y pueden variar dentro de una misma especie. El más común de ellos es el alga verde unicelular *Trebouxia*, presente en muchos líquenes de zonas templadas y ártico-alpinas (**Tabla I**).

Tabla I. Algas liquenizadas.

Clase	Familia	Género
<i>Xanthophyceae</i>	Tribonematales	<i>Heterococcus</i>
<i>Phaeophyceae</i>	Ectocarpales	<i>Petroderma</i>
<i>Chlorophyceae</i>	Volvocales	<i>Chlamydomonas</i> <i>Coccomyxa</i> <i>Glyoeocystis</i> <i>Asterochlorus</i> <i>Dictyochloropsis</i> <i>Myrmecia</i> <i>Pseudotrebouxia</i> <i>Trebouxia</i> <i>Chlorella</i> <i>Pseudochlorella</i>
	Chlorosarcinales	<i>Chlorosarcinopsis</i> <i>Nannochloris</i>
	Chaetophorales	<i>Coccobotrys</i> <i>Dilabifilum</i> <i>Pseudopleurococcus</i> <i>Lepsoisira</i> <i>Protococcus</i> <i>Trociscia</i> <i>Stichococcus</i>
	Prasiolales	<i>Prasiola</i>
	Ulvaes	<i>Blidingia</i>
	Chladophorales	<i>Chladophora</i>
	Trentepohliales	<i>Cephaleuros</i> <i>Phycopeltis</i> <i>Trentepohlia</i>

En sólo 20 especies de líquenes, el hongo pertenece a la división *Basidiomycota* y en el resto, son *Ascomycota* (**Tabla II**). De los cuarenta y seis órdenes conocidos de hongos, dieciséis forman líquenes y de ellos sólo seis forman únicamente líquenes, es decir que no se conocen como hongos de vida libre (Mehrotra y Aneja, 1990).

Tabla II. Hongos liquenizados.

Subdivisión	Número de especies	Número de especies liquenizadas	%
<i>Ascomycotina</i>	28650	13250	46,26
<i>Basidiomycotina</i>	16000	50	0,31
<i>Deuteromycotina</i>	17000	200	1,18
<i>Mastigomycotina</i>	1170	1	0,09
<i>Myxomycotina</i>	62	2	0,32

1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES DE LA SIMBIOSIS LIQUÉNICA

Mediante un largo proceso de co-evolución, algas y hongos han desarrollado un perfecto estado de simbiosis, permitiéndoles habitar y colonizar numerosos tipos de ecosistemas. Los ecosistemas dominados por los líquenes son aquellos lugares en los que las plantas vasculares están en sus límites fisiológicos, mientras que los talos poiquilohídricos de los líquenes poseen la ventaja ecológica de sobrevivir al frío y al calor extremos y al estrés hídrico, saliendo indemnes al permanecer en un estado de dormición (Honegger, 1991a)

Generalmente, los líquenes son considerados como un tipo de simbiosis mutualista, en el que la capacidad de supervivencia de ambas partes resulta favorecida a causa del estado simbiótico (Smith y Douglas, 1987). Hill (1980) afirma que el hongo, en el entorno liquénico, es incapaz de obtener hidratos de carbono de otra fuente que no sea el alga, de modo que la simbiosis liquénica implicaría un

mecanismo de transferencia de carbohidratos, como productos resultantes de la fotosíntesis del alga, desde el fotobionte al micobionte.

Los micobiontes garantizan que exista una iluminación adecuada para la fotosíntesis del alga, facilitan el intercambio gaseoso entre las células del fotobionte y compiten por el espacio sobre el que crecer. La escasez de algunas algas verdes más comunes, junto con las limitaciones espaciales de crecimiento para estas algas unicelulares, ya que aparecen sobre la corteza de los árboles, el suelo o sobre superficies rocosas, son factores que han impuesto una enorme presión evolutiva en los hongos formadores de líquenes por crecer sobre un sustrato. Para ello, estos organismos han desarrollado una serie de estructuras vegetativas en las cuales las células del fotobionte puedan crecer y desarrollarse, en las que sean controladas y mantenidas (Honneger, 1991b).

La posesión de un sistema de poros en la superficie del talo trae como consecuencia la limitación de las pérdidas respiratorias del hongo, el mantenimiento de un ambiente húmedo para el clorobionte y el relegar la mayor parte de la superficie líquénica para el almacenamiento de agua. Las variaciones en la cantidad de agua almacenada bajo la superficie del liquen pueden ser correlacionadas con la demanda ambiental de evaporación y pueden también explicar las variaciones en el contenido óptimo de agua para la fotosíntesis neta en diferentes especies (Curso de Doctorado de Biología Molecular y Biotecnología de Líquenes, Facultad de Biología, UCM, 2005).

1.1. Morfología y fisiología del talo líquénico

Más de un 40 % de los micobiontes líquénicos y la mayoría de los taxones foliosos y fruticosos se asocian con algas del género *Trebouxia*. La complejidad morfológica de estos talos es el resultado de un largo proceso de cohabitación de *Trebouxia* con ascomicetes lecanorales. Este es el caso del liquen epifito *Evernia prunastri*, cuyo fotobionte pertenece al género *Trebouxia* y el micobionte es un hongo ascomicete que da nombre a la especie líquénica.

Un abundante grupo de especies líquénicas ha reducido el ciclo reproductivo sexual y se dispersan muy eficazmente mediante propágulos vegetativos. De este modo, solucionan el problema relacionado con la adquisición de células compatibles

del género *Trebouxia* (Ott, 1987). El micobionte se reproduce sexualmente en la simbiosis líquénica, mientras que el fotobionte reprime los mecanismos de reproducción sexual, siendo controlado por el hongo de forma parasitaria, manteniendo así el número de células constantes.

Las células de *Trebouxia* contienen un cloroplasto grande y central, en cuyo interior se encuentra el pirenoide (Friedl, 1989) (**Fig. 1**). La pared celular tiene una parte interna fibrilar y otra capa amorfa más externa, compuesta de polisacáridos y proteínas. Después de la formación de autosporas, la pared autosporangial se degrada mediante la acción de enzimas hidrolíticas derivadas del alga.

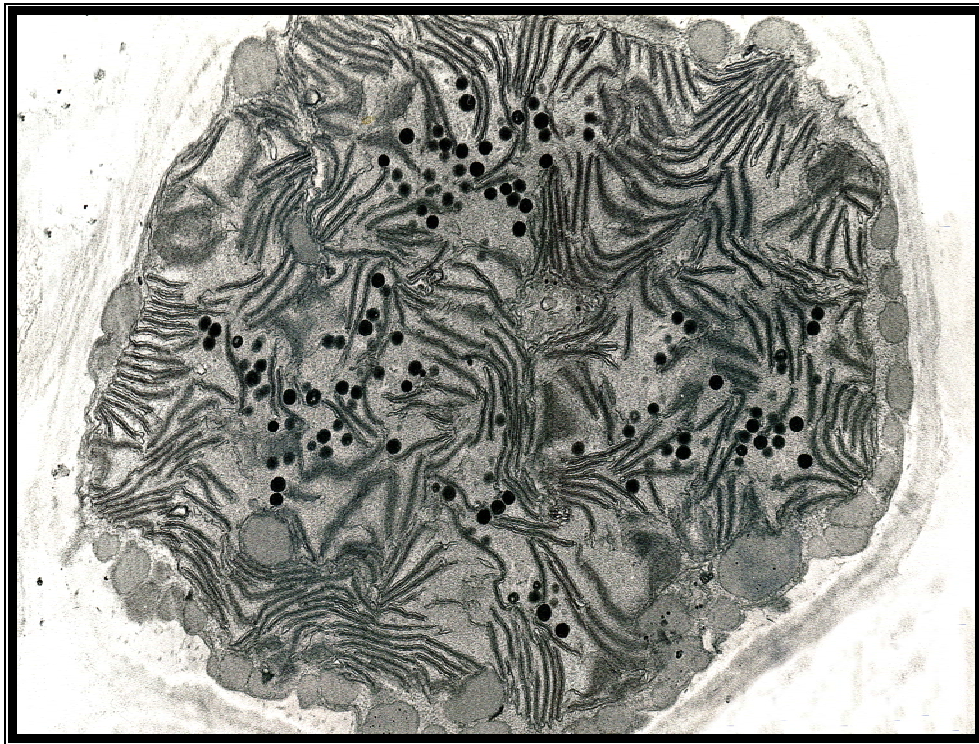


Figura 1. Micrografía de una célula de *Trebouxia*.

El talo líquénico (**Fig. 2A**) consiste en un córtex superior y, a veces, inferior y una médula formados por tejido fúngico y una capa de fotobiontes o gonidial, en la periferia de la médula y bajo el córtex, en la cual, las células de algas o de cianobacterias son envueltas por las hifas fúngicas, y se disponen de tal manera que puedan captar la luz solar para fotosintetizar (Ahmadjian, 1993).

Los micobiontes contactan con las células de *Trebouxia* mediante unas prolongaciones intraparietales denominadas haustorios, siendo el resultado de un proceso de desarrollo altamente coordinado en ambos biontes (Honneger, 1984). Durante la maduración, las células del alga van expandiéndose lentamente a través de una serie de procesos de crecimiento intercalar del hongo entre el complejo haustorial (Honneger, 1985).

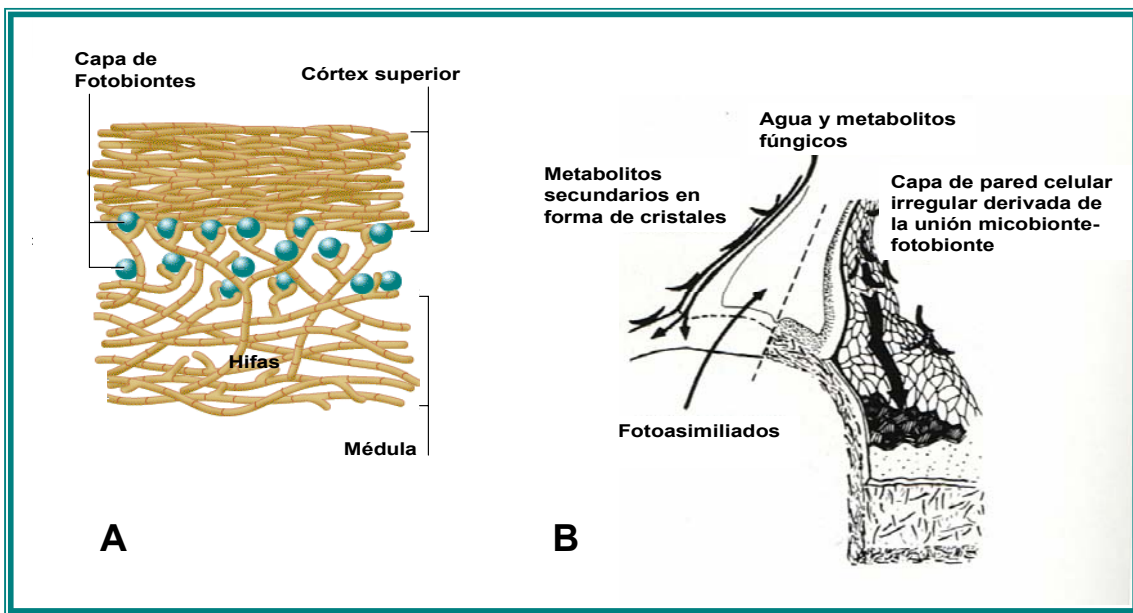


Figura 2. A) Esquema del talo líquénico. B) Intercambio de metabolitos entre el micobionte y el fotobionte en la zona de contacto o haustorio intraparietal.

Los elementos fúngicos implicados en la formación de haustorios son hifas aéreas que emergen procedentes de la médula interna del talo. Existe un *continuum* apoplástico entre la parte fúngica y las células de *Trebouxia* donde se produce la translocación de solutos como metabolitos tróficos y proteínas reguladoras (**Fig. 2B**), además del intercambio gaseoso del fotobionte dado que la superficie de las paredes celulares de ambos biontes permanecen secas en la médula, incluso bajo condiciones saturantes de hidratación (Brown *et al.*, 1987).

El sistema de intercambio de metabolitos se realiza directamente desde los espacios intercelulares, por difusión pasiva o facilitada, o por transporte activo mediante fosforilación-defosforilación acoplado a la enzima adenilato ciclasa para los

azúcares. En los líquenes haustoriales, el uso de metabolitos marcados ha demostrado que el haustorio no representa ninguna ventaja en el intercambio de nutrientes. Su papel, hoy desconocido, podría ser exclusivamente el de un relicto de un pasado decididamente parasitario (Curso de Doctorado de Biología Molecular y Biotecnología de Líquenes, Facultad de Biología, UCM, 2005).

Las algas transfieren ribitol, sorbitol o eritritol (glucosa cuando el fotobionte es una cianobacteria) al hongo mediante difusión, para ser convertido en manitol, arabitol o xilitol en el interior de las hifas (Ahmadjian, 1993; Honda y Villegas, 1999). Las algas pueden liberar también otras sustancias, tales como vitaminas o micronutrientes necesarias para el desarrollo del micobionte, y, por parte de éste, existe un transporte de fenoles y poliaminas hacia el alga.

Los compuestos derivados del metabolismo secundario del hongo (fenoles líquénicos), el estado de hidratación del córtex, su grosor y el contenido en minerales influyen en la absorción y transmisión de la luz a esta capa. En el córtex se produce la captación de agua (Larson, 1984), provee de estabilidad mecánica a todo el talo, protege a las células del fotobionte de una sequía o de luz excesiva mientras que la laxitud de las hifas en la médula facilita el intercambio gaseoso (Ahmadjian, 1993). Este último también se da en la capa cortical donde se forman cifelos o pseudocifelos por la pérdida de hifas aéreas, de las capas superficiales hidrofóbicas del micobionte o por la aparición de grupos de materia no-aglutinante (Jahns, 1988).

En líquenes heterómeros (**Fig. 3**), cuando el contenido hídrico del talo es bajo, permite la difusión de CO₂, mientras que la matriz extracelular gelatinosa del córtex completamente hidratado bloquea la difusión. Por tanto, existe un descenso de la actividad fotosintética del fotobionte siempre que exista un contenido hídrico muy elevado en el talo (Lange y Tenhunen, 1981), aunque la capacidad carboxilante no parece verse afectada. Esta particularidad representa una gran ventaja evolutiva, y es que no se requiere agua para restaurar el aparato fotosintético tras unas condiciones de estrés hídrico (Brown *et al.*, 1987).

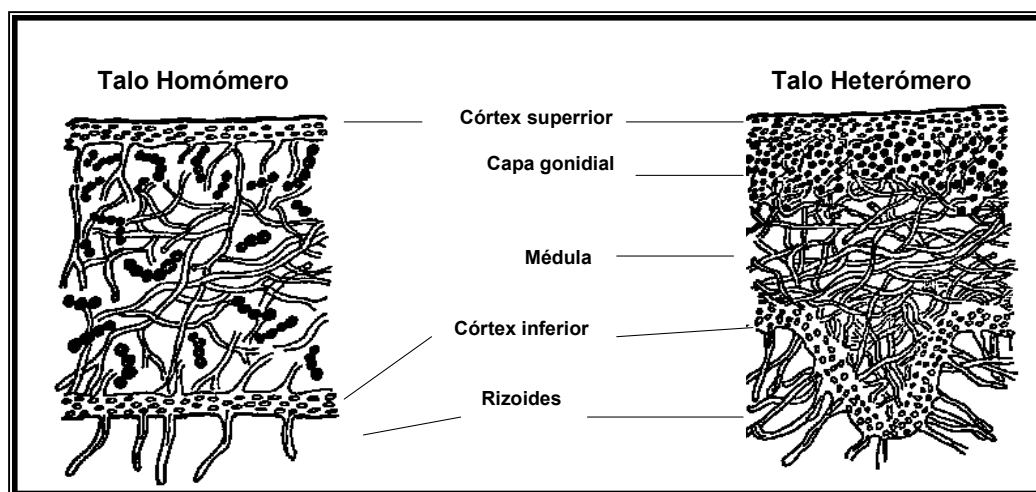


Figura 3. Esquema de los tipos de talo líquénico. En el talo homómero ambos biontes están distribuidos uniformemente, y en el heterómero ocupan diferentes estratos.

1.2. Síntesis de compuestos secundarios

Los fenoles son compuestos aromáticos formados por dos o tres anillos fenólicos enlazados por oxidaciones y uniones éster. Algunos son sustancias propias de líquenes (Elix y Whitton, 1984) y parecen tener capacidad herbicida y antimicrobiana (Rundel, 1978; Vartia, 1973). *E. prunastri* tiene cuatro especies distintas de fenoles, identificadas como atranorina, cloroatranorina y los ácidos evérnico y úsnico (Culbertson, 1969). El ácido evérnico, junto con la fracción atranorina/cloroatranorina representan un 70 % y un 30 %, respectivamente, del contenido total de fenol localizado a nivel del córtex. La composición fenólica de la médula es del 18 % para el ácido evérnico, 37 % para atranorina/cloroatranorina y 45 % en el caso del ácido úsnico (Pedrosa y Legaz, 1992).

La estructura química, la biogénesis y el papel biológico de los fenoles de líquenes son muy diferentes de los de flavonoides de plantas. Los fenoles de líquenes son derivados policetónicos mientras que los flavonoides están basados en precursores fenilpropánicos. Los fenoles de líquenes no están glicosilados, salvo raras excepciones, y aparecen comúnmente depositados sobre las paredes celulares, tanto del micobionte como del clorobionte (Ahmadjian y Jacobs, 1985; Ávalos y Vicente, 1987), mientras que los flavonoides son usualmente glicosilados y acumulados dentro de la vacuola, para ser expulsados a través del tonoplasto como

respuesta a condiciones ambientales muy precisas, como puede ser la invasión por un patógeno.

Los fenoles de líquenes son usualmente utilizados como filtros solares ya que las intensidades luminosas muy altas pueden causar fotoblanqueo de las algas por foto-oxidación de clorofilas (Millanes y Vicente, 2003). Cristalizan en el córtex superior actuando de pantalla protectora (Rundel, 1978), pero parte de ellos quedan retenidos sobre las paredes del fotobionte (Ahmadjian y Jacobs, 1985; Honegger, 1986; Ávalos y Vicente, 1987) e incluso pueden penetrar en el interior del alga desarrollando acciones ficocidas (Ávalos y Vicente, 1987), aunque, en clorolíquenes, las algas desvían las rutas de síntesis de fenoles hacia compuestos menos tóxicos que se acumulan en la superficie de las paredes del alga y el hongo (Culberson y Ahmadjian, 1980). Su síntesis y movilidad están reguladas por fitocromo (Mateos *et al.*, 1993).

También pueden actuar como agentes ficocidas gracias a su capacidad para inactivar proteínas enzimáticas (Cochietto *et al.*, 2002; Vicente y Legaz, 1988) y para inhibir tanto la respiración como la fotosíntesis (Vavasseur *et al.*, 1991). A través de estos fenoles, el micobionte puede regular el tamaño de la población del alga dentro del talo (Honegger, 1987).

1.3. Regulación del metabolismo de L-arginina dirigido hacia la síntesis de poliaminas en *E. prunastri*

Para los líquenes que contienen cianobiontes, los productos primarios de asimilación de nitrógeno son glutamato y glutamina (Rai, 1988). Las especies líquénicas que contienen algas verdes como fotobionte acumulan los ácidos L-glutámico y L-aspartico como productos primarios de la asimilación de amonio (Ramakrishnan y Subramanian, 1966), mientras que *E. prunastri*, cuyo fotobionte es una *Chlorophyta* del género *Trebouxia*, contiene una elevada concentración de L-arginina, lo que constituye la reserva de aminoácidos libres del talo (Legaz, *et al.* 1982).

Este aminoácido puede ser hidrolizado por diferentes isoformas de arginasa (Legaz y Vicente, 1983; Planelles y Legaz, 1987; Pedrosa y Legaz, 1995) para producir L-ornitina y urea o descarboxilado por una arginasa sintetizada fundamentalmente por el fotobionte, para producir agmatina (Vicente y Legaz, 1981),

la cual es más tarde hidrolizada produciendo putrescina y urea (Vicente y Legaz, 1982) (**Fig. 4**). Los talos que contienen algas verdes como fotobionte producen ureasa inducida por urea (Shapiro, 1977; Vicente *et al.*, 1983) así como por rehidratación del talo, posiblemente como resultado de la movilización de urea cristalizada en el mismo (Rodríguez y Vicente, 1991).

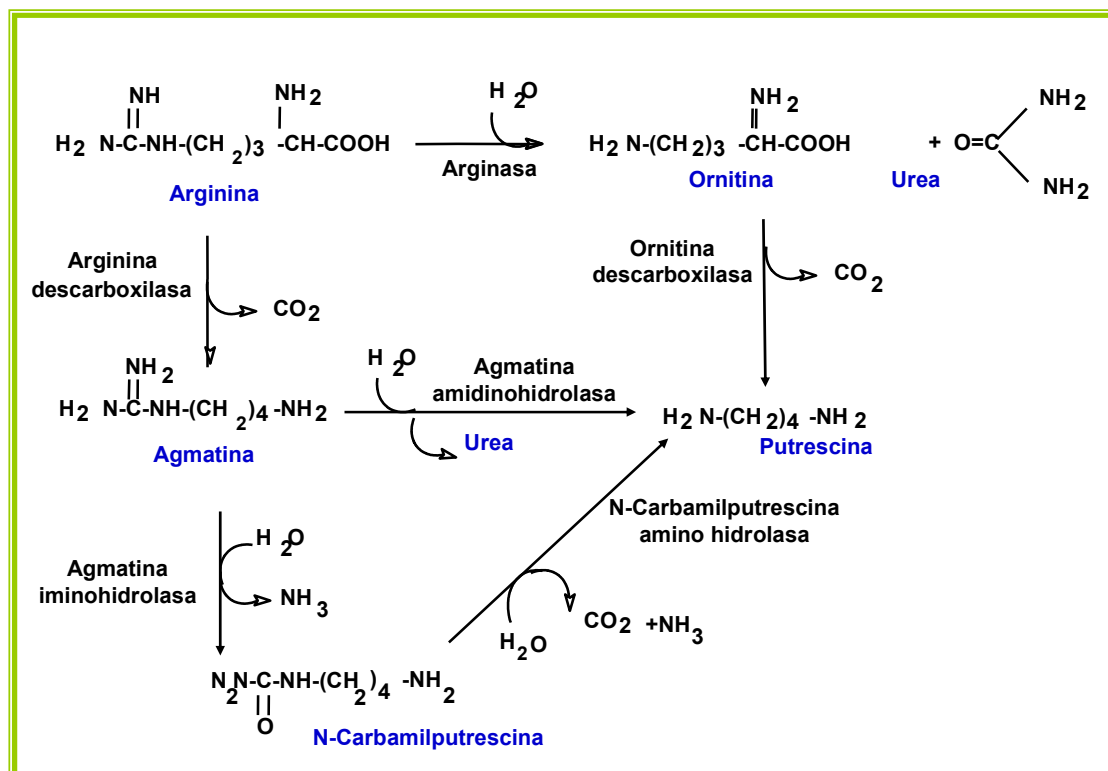


Figura 4. La arginina en líquenes es rápidamente metabolizada tras la hidratación del talo produciendo putrescina, bien por una vía hidrolítica mediante arginasa produciendo ornitina y urea, o descarboxilativa vía agmatina. La arginasa es una enzima inducible por sustrato cuando el talo es incubado en oscuridad (Legaz y Vicente, 1980), aunque también es activa en luz.

La urea es hidrolizada por ureasa, rindiendo amonio y dióxido de carbono y pudiendo ser utilizado éste último en la producción de fenoles liquénicos (Blanco *et al.*, 1984). La ureasa es sintetizada en el alga principalmente (Mosbach, 1973) y puede ser inhibida por los fenoles que entran dentro del fotobionte (Ávalos y Vicente, 1987; Legaz y Vicente, 1989). Por tanto, el micobionte puede regular la producción de fotosintetizados en la medida en que un exceso en la concentración de carbohidratos se reflejaría en un aumento en la concentración de fenoles, los cuales son segregados

al medio, inhibiendo la actividad ureasa y regulando así la producción de dióxido de carbono y por tanto, la síntesis de compuestos carbonados.

Se puede concluir diciendo que en el liquen *E. prunastri* están presentes las dos rutas metabólicas, hidrolítica y descarboxilativa, de degradación de la arginina, puesto que se han purificado las actividades arginina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa, que sintetizan la diamina putrescina, precursora de la síntesis de espermidina y espermina, e incluso una ruta alternativa que rinde putrescina vía agmatina (**Fig. 4**); y que arginasa y arginina descarboxilasa son actividades mutuamente excluyentes en el tiempo (Legaz *et al.*, 1986).

La putrescina regula la tasa biosintética de poliaminas, mediante activación de arginasa y agmatina amidinohidrolasa e inhibición de arginina descarboxilasa (Legaz, 1985). Cabe esperar que cualquier cambio significativo en la distribución interna de las poliaminas en el talo pueda conducir a una cadena de efectos regulatorios sustanciales.

En general, ambos biontes poseen todas las actividades enzimáticas descritas. Sin embargo, arginasa, agmatina iminohidrolasa y ornitina descarboxilasa están localizadas fundamentalmente en el micobionte de *E. prunastri*, mientras que arginina descarboxilasa y agmatina amidinohidrolasa se encuentran principalmente en el clorobionte (Legaz, 1985). Por tanto, en términos de actividad total, el micobionte es el que desarrolla la mayor parte de las actividades enzimáticas antes descritas por ser el componente mayoritario del talo siendo la principal fuente de síntesis de putrescina en el liquen. Aún así, una pequeña reserva de la diamina se encuentra en el fotobionte ya que la enzima agmatina aminohidrolasa desarrolla una mayor actividad en este último (Vicente y Legaz, 1982).

1.4. Regulación de la población del fotobionte

La población de fotobiontes se multiplica más rápidamente en los márgenes del talo, permaneciendo constante en el resto del liquen. Honegger (1987) establece que el crecimiento de los fotobiontes en zonas del talo alejadas de los márgenes se desarrolla lentamente y con dificultad, probablemente por un mecanismo inhibitorio por parte del hongo, como puedan ser los fenoles (Honegger, 1991a).

El porcentaje más alto de células jóvenes en los talos, tanto en cloro como en cianobiontes se encuentran en invierno en *Ramalina fraxinea*, en invierno y primavera en *Parmelia sulcata* y *Peltigera canina*, y en otoño e invierno en *Evernia prunastri* (Czeczuga y Czeczuga-Sumenik, 2002). Pero el número de fotobiontes en el talo permanece más o menos constante observándose pocos aplanosporangios a lo largo del año, lo que sugiere que el control de la división celular va más allá de presiones ambientales. Además las hifas haustoriales penetran los aplanosporangios antes de la rotura de la célula madre, permitiéndole el contacto directo con las algas antes de su dispersión al azar.

Los fotobiontes no se reproducen sexualmente en la simbiosis líquénica y, por tanto, la única fuente de variabilidad genética ha quedado reducida a la mutación. De esta manera la capacidad de cambiar y ocupar otro hábitat es muy pequeña. De hecho fotobiontes como *Trebouxia* y *Pseudotrebouxia* rara vez se desarrollan en la naturaleza como algas de vida libre.

2. LECTINAS LIQUÉNICAS

Los líquenes son organismos simbióticos en los que uno o ambos simbioses son obligados, específicos y especializados. Forman asociaciones simbióticas íntimas y establecidas a largo plazo para formar una nueva entidad biológica diferente de sus componentes individuales. Ambos biontes aparecen en la naturaleza entre una mezcla de millones de microorganismos no simbióticos y requieren mecanismos de combinación compatible para formar la asociación (Galun y Kardish, 1995). Por ello, se requiere una especificidad suficiente para que dicha asociación se establezca. En este contexto, se puede definir la especificidad como la asociación preferente, aunque no exclusiva, de un bionte con otro (Bubrick, 1988).

Por otra parte, la especificidad requiere mecanismos de reconocimiento finamente regulados. Cuando las células del alga o la cianobacteria proliferan dentro de un talo líquénico en crecimiento, las células hijas están envueltas por hifas fúngicas

que deben reconocer las nuevas células del alga como compatibles (Ahmadjian, 1993). Por ello, son absolutamente necesarios mecanismos de reconocimiento entre simbioses, no sólo para la formación de *novas* de nuevas asociaciones, sino también para el mantenimiento del equilibrio simbiótico en el líquen vivo.

2.1. Naturaleza, fuentes y funciones de las lectinas

Las lectinas constituyen un grupo heterogéneo de glicoproteínas, de origen no inmune, con sitios de unión de naturaleza no catalítica que son capaces de reconocer y de unirse reversiblemente a azúcares específicos. Desde que Stillmark descubrió hemaglutininas en semillas de *Ricinus communis*, en 1888, esta clase de proteínas ha sido encontrada con posterioridad principalmente en dicotiledóneas (Fariers *et al.*, 1977; Mandel *et al.*, 1994; Kamemura *et al.*, 1993), pero también en monocotiledóneas (Crowley *et al.*, 1984; Kilpatrick y Yeoman, 1978, Singh *et al.*, 1993), bacterias (Heerze *et al.*, 1992; Heerze y Armstrong, 1993), animales (Oda *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 2001; Thiel, 1992), levaduras (Viard *et al.*, 1993), musgos (Yoshida *et al.*, 1994), plasma humano (Golaz *et al.*, 1995) y en varias asociaciones simbióticas tales como *Rhizobium-leguminosa* (Smit *et al.*, 1992), micorrizas (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1990) y líquenes (Bubrick *et al.*, 1985; Petit, 1982).

Las primeras referencias sobre lectinas como factores de reconocimiento usando líquenes como material biológico mostraban que dichas glicoproteínas estaban involucradas en mecanismos de reconocimiento (Bubrick *et al.*, 1985; Lockhart *et al.*, 1978), papel que le ha sido también adjudicado en otras simbiosis (Díaz *et al.*, 1989). Sin embargo, estas proteínas también han sido relacionadas con mecanismos parasitarios (Elad *et al.*, 1983; Saikawa, 1982), en procesos de ataque y defensa sobre la base de su actividad antiviral (Kumar *et al.*, 1993) o antifúngica (Viard *et al.*, 1993), como mecanismos de defensa frente a ataques de animales (Hoedemaeker *et al.*, 1993) y otras muy diversas.

Estudios bioquímicos revelan que estas lectinas son glicoproteínas altamente conservadas con un alto grado de homología (Chrispeels y Raikhel, 1991) y sugieren que están codificadas por genes en tándem y forman parte de una familia de proteínas envueltas en mecanismos de defensa en plantas. Aunque el papel fisiológico de las

lectinas es aún sujeto de controversia, a menudo se han visto envueltas en algunos procesos metabólicos, gracias a su actividad enzimática subsidiaria: galactosidasas y manosidasas con actividad fitohemaglutinina (Shannon y Hankins, 1981), arginasas envueltas en el reconocimiento de algas liquénicas (Molina *et al.*, 1993) y elicitores en la producción de fitoalexinas en *Pisum sativum* (Toyoda *et al.*, 1995).

2.2. Las lectinas de los líquenes son glicoproteínas fúngicas

Estudios ultraestructurales acerca de la relación entre los simbiontes de un líquen en un talo o aquellos llevados a cabo usando protocolos de resíntesis sugieren que tal relación puede ser debida a la existencia de factores de reconocimiento en la superficie celular (Ahmadjian *et al.*, 1978). Varias fitohemaglutininas habían sido detectadas en líquenes desde antiguo (Andrews *et al.*, 1992; Barrett y Howe, 1968; Berheimer y Farkas, 1953; Estola y Vartia, 1955; Howe y Barrett, 1970; Xavier-Filho *et al.*, 1971; Xavier-Filho *et al.*, 1980) pero el hecho de que esas aglutininas se unieran al fotobionte apropiado fue descrito por primera vez por Lockhart *et al.* (1978) usando *Peltigera canina* y *P. polydactyla*, dos especies de cianolíquenes que contienen *Nostoc* como cianobionte. Una lectina semejante fue caracterizada de *P. horizontalis* (Petit, 1982) y parcialmente purificada de *P. canina* var. *canina*, por Petit *et al.* (1983). La capacidad de unión de esta última proteína a las células de *Nostoc punctiforme* fue estudiada marcándola con Isotiocianato de Fluoresceína (ITCF).

Bubrick y Galun (1980) demostraron que una fracción proteica aislada de talos de *Xanthoria parietina* y marcada con fluorescamina se unía eficientemente a clorobiontes cultivados, previamente aislados de *X. parietina*, *Caloplaca auriantia* y *C. citrina* (familia *Teloschistaceae*). Dicha proteína marcada podía ser detectada en la superficie de la pared celular de las algas, concretamente en fantasmas, paredes celulares de algas que han perdido su protoplasto. Se denominó ABP (Algal Binding Protein) y fue encontrada en el micobionte de *Xanthoria* cultivado *in vitro* (Bubrick *et al.*, 1981) apareciendo uniformemente distribuida a lo largo de toda la longitud de las hifas y restringida a sus paredes celulares. La hipótesis de Galun, que implicaba un quimiotactismo positivo del alga potencialmente compatible, ha sido resumida en la **Figura 5**.

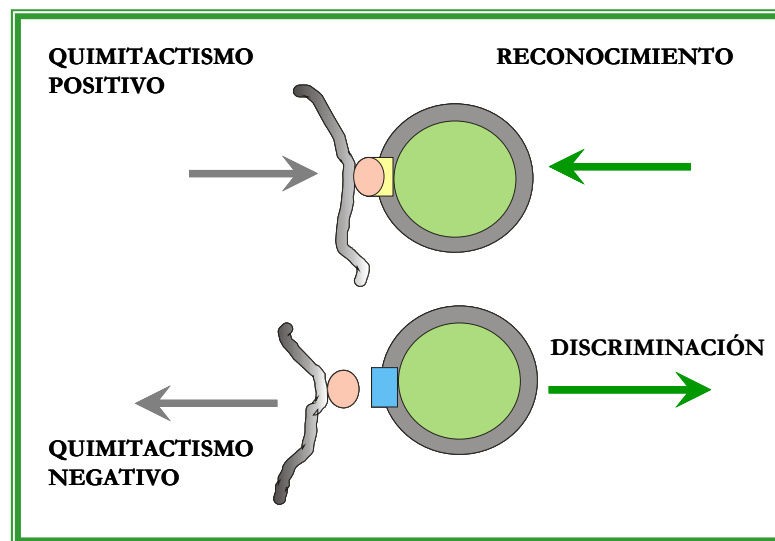


Figura 5. Hipótesis de la Prof. Margalith Galun sobre el mecanismo de reconocimiento o discriminación entre simbiontes, basada en sus propios resultados experimentales trabajando con la lectina ABP de *Xanthoria parietina*.

Esta proteína ABP fue parcialmente purificada y caracterizada por Bubrick *et al.* (1985) como un polipéptido de baja masa molecular (12,5 kDa). Una proteína con similar actividad ligante fue más tarde obtenida del cianoliquen *Nephroma laevigatum* (Kardish *et al.*, 1991) y purificada como una proteína dimérica compuesta por dos monómeros de 52 kDa y 55 kDa de masa molecular. También se han caracterizado parcialmente lectinas de *Peltigera membranacea* (Lehr *et al.*, 1995) y de cefalodios de *Peltigera aphthosa* (Lehr *et al.*, 2000), esta última con un masa molecular de 20 kDa. Para definir realmente cualquiera de estas proteínas como auténticas lectinas, Galun y Kardish (1995) establecen las siguientes condiciones que deben ser cumplidas:

- La lectina debe ser producida por el hongo independientemente de su situación simbiótica.
- Debe ser una proteína de superficie para posibilitar el contacto estérico directo con potenciales clorobiontes (o cianobiontes).
- Debe haber sitios de recepción para la lectina sobre la superficie del fotobionte potencial, lo cual implicaría la reacción de reconocimiento.
- Vía esta interacción, la lectina sería capaz de discriminar entre fotobionte compatible o incompatible.
- Debe haber fotobiontes compatibles en el ambiente inmediato al hongo para que la lectina pueda unirse a ellos.

Todas las glicoproteínas de origen liquénico estudiadas hasta ahora como factores de reconocimiento celular cumplen los requisitos especificados.

2.3. Otras proteínas de pared celular del micobionte en la zona de contacto con las células del alga

Las hifas fúngicas en la capa de algas producen proteínas segregables que forman una capa de bastoncillos sobre la pared celular. Se han propuesto dos funciones principales para estas proteínas (Honegger, 1991a):

1. En el sitio de contacto de la hifa en crecimiento con la superficie de la pared celular de un alga joven, estas proteínas segregables difunden apoplásticamente a través de la matriz de la pared y se distribuyen por agregación sobre la superficie del simbionte fotoergónico, sellando el *continuum* apoplástico con una cubierta hidrofóbica.
2. La capa de bastoncillos puede también servir para canalizar los flujos apoplásticos de solutos desde la superficie del talo a la capa de algas, y viceversa, durante los ciclos continuos de hidratación y desecación en el hábitat natural de los líquenes. Consecuentemente, estas proteínas han sido identificadas como pertenecientes a la clase de hidrofobinas I (Scherrer *et al.*, 2000).

Ningún papel en el reconocimiento fúngico del alga compatible ha sido adjudicado hasta el presente a estas hidrofobinas. Son principalmente sintetizadas en las capas de algas y medular de *Teloschistaceae*. Por otra parte, la capa cortical acumula fenoles que incrementan la hidrofobicidad de la pared celular. En contraste con esto, las hifas de las capas medular y algal de *Cladoniaceae* y *Parmeliaceae* excretan polifenoles que cristalizan sobre o en la capa de bastoncillos superficial de la pared celular del hongo (Honegger, 1984), así como sobre la pared celular del alga (Ávalos y Vicente, 1987) y reducen la rehidratación de la hifa (Escribano y Legaz, 1988; Honegger, 1986).

3. EL RECONOCIMIENTO ALGA-HONGO DEBE SER UN PROCESO CONTINUO

Las células hijas resultantes de la división de las algas dentro del talo deben ser reconocidas por el componente fúngico como células compatibles para garantizar la supervivencia (Ahmadjian, 1993). La compatibilidad recae en el hecho de que dichas algas expresen un ligando de pared para la lectina fúngica, lo que implica que la producción de la ureasa y la secreción de la lectina deberían estar sincronizadas para garantizar el reconocimiento específico de las células hijas.

De acuerdo con Czeuczuga y Czeuczuga-Sumenik (2002), el porcentaje más alto de las células jóvenes de cloro- y cianobiontes se encontró en talos de líquenes recolectados en invierno de *Ramalina fraxinea*, en invierno y primavera en *Parmelia sulcata* y *Peltigera canina*, y en otoño e invierno en *Evernia prunastri*. Si las células más jóvenes son aquellas que emergen de un proceso de división celular, el micobionte podría ser potencialmente capaz de reconocer los nuevos clorobiontes mediante la producción de la correspondiente lectina. Esta aparente variación estacional de la habilidad de las células del clorobionte para dividirse en el talo está de acuerdo con las observaciones previas presentadas por Fiechter y Honegger (1988) para *Hypogymnia physodes* y por Slocum *et al.* (1980) para *Flavoparmelia caperata*.

Cabe preguntarse entonces la posibilidad de que estos tres hechos: la secreción de la lectina por parte del hongo, la producción del ligando por parte del clorobionte y la división celular estén sincronizados en el tiempo para asegurar el crecimiento continuo del talo y sean consecuencia de distintos factores ambientales como la luz y la temperatura.

4. MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE RECONOCIMIENTO DE BIONTES QUE POSEEN RECEPTORES ESPECÍFICOS PARA LECTINAS

4.1. Especificidad por un azúcar

Las lectinas fueron primero purificadas de plantas y caracterizadas por su capacidad para aglutinar eritrocitos. Las de la familia *Leguminosae*, favina, lectina de guisante y concanavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis*, se unen a residuos α -D-manosa y α -D-glucosa, y también son capaces de unir Ca^{2+} y Mn^{2+} . La proteína ABP, parcialmente purificada de *X. parietina*, es capaz de unirse a ConA y a ricina (RCA) de *Ricinus communis* (Bubrick *et al.*, 1985). Por otra parte, Marx y Peveling (1983) demostraron que muchos clorobiontes aislados de diferentes especies de líquenes y cultivados después eran capaces de unir lectinas comerciales, incluyendo ConA y RCA, siendo específica esta última de α - y β -D-galactosa.

4.2. Las lectinas desarrollan actividades enzimáticas adicionales a su actividad aglutinante

La proteína ABP parcialmente purificada de *X. parietina* de acuerdo con lo descrito por Bubrick *et al.* (1985) contiene dos proteínas que pudieron ser separadas por SE-HPLC (Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography). Una de ellas es una arginasa glicosilada de pared celular que hidroliza arginina en ornitina y urea mientras que la otra fue caracterizada como una arginasa no glicosilada (Molina *et al.*, 1993) y segregable SAX (Arginasa Segregable de *Xanthoria*).

La enzima glicosilada marcada con fluoresceína se unía a paredes celulares de clorobiontes recién aislados de *X. parietina*, aunque la eficiencia de esta unión era considerablemente incrementada incubando previamente las algas recién aisladas en una disolución de urea. Este tratamiento era suficiente para hacer aparecer en pared una ureasa glicosilada, estructuralmente idéntica a la ureasa segregada al medio a tiempos más largos de incubación. Esta glicoproteína contenía un gran resto poligalactosa unido al polipéptido (Pérez-Urria y Vicente, 1989).

En el caso de *Evernia prunastri*, un cloroliquen de la familia *Parmeliaceae* que también produce ABP y SAE (Arginasa Segregable de *Evernia*), los clorobiontes, hipotéticamente incompatibles con los micobiontes de *Xanthoria parietina*, fueron cultivados con urea y mostraban una fluorescencia verde inequívoca cuando eran incubados con ABP marcada. Sin embargo, la intensidad de la emisión de fluorescencia era del orden de 10 veces menor que la observada para los clorobiontes de *Xanthoria* con ureasa particulada en pared y tratados en las mismas condiciones.

Dos hechos contribuían a relacionar ambas proteínas enzimáticas en el proceso de unión de ABP a clorobiontes de ambas especies de líquenes. El primer hecho consistía en que, tras la unión de la proteína ABP a las células de ambos clorobiontes, visualizable en esta ocasión mediante marcaje previo con ferritina y observación de las células al microscopio electrónico de transmisión, la actividad ureasa se volvía citoquímicamente indetectable (**Fig. 6**).

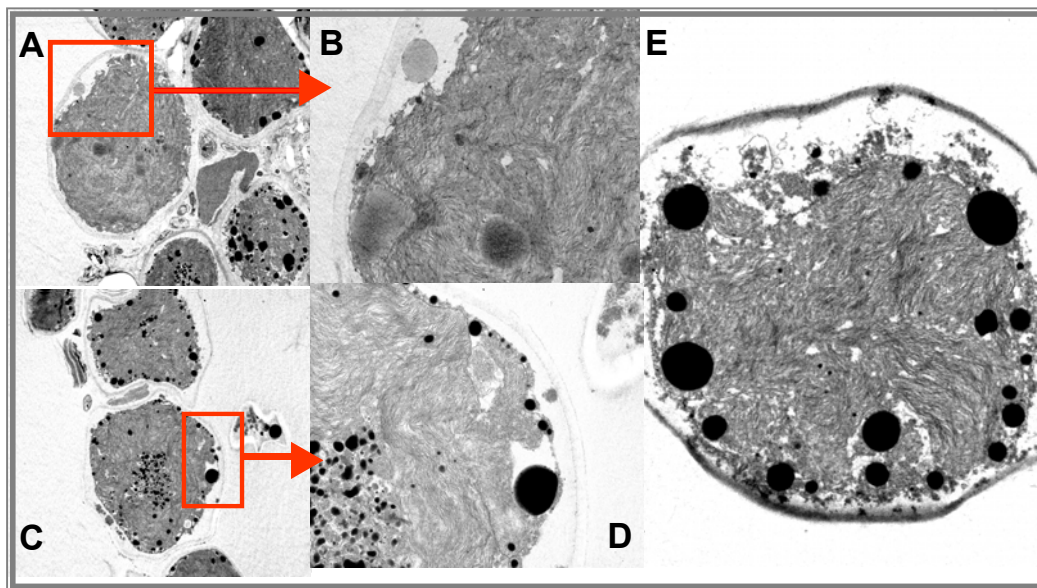


Fig. 6. Detección citoquímica de ureasa en paredes del clorobionte de *X. parietina* como depósitos de CoS densos a los electrones. A) Control incubado en tampón. B) Ampliación de la zona señalada en A. C) Control de clorobiontes incubados en CoCl_2 sin urea. D) Ampliación de la zona recuadrada en C. E) Clorobiontes de *X. parietina* incubados en urea y CoCl_2 . Tomado de Legaz *et al.* (2004).

Sin embargo, ambas actividades enzimáticas eran parcialmente recuperadas después de la desorción de la ABP ligada a las células con galactosa (Molina *et al.*, 1993). El segundo consistía en que ambas actividades enzimáticas, arginasa y ureasa, se perdían progresivamente en función del tiempo de preincubación *in vitro* de ambas proteínas glicosiladas antes de la adición de los correspondientes sustratos.

Además de estos dos hechos experimentales, que revelan inequívocamente una interacción proteína-proteína, la incubación de una preparación purificada de ABP con paredes celulares de clorobiontes de *X. parietina* que contenían ureasa detectable reducía notablemente la cantidad de arginasa glicosilada eluída de la columna de SE-HPLC, mientras que el pico correspondiente a la arginasa no glicosilada no era afectado por la incubación.

En resumen, el hongo produce dos clases de lectinas con diferentes funciones:

1) Las enzimas ABP, localizadas en las paredes celulares de las hifas, promueven la interacción física entre el hongo y su correspondiente alga específica.

2) Lectinas segregables, cuyo papel pudiera estar relacionado con el reclutamiento de algas hacia la vecindad del micelio fúngico. Este mecanismo optimizaría la unión incrementando las probabilidades de los ocasionales contactos productivos y prevendría la pérdida de esos contactos seguidos de la muerte celular del alga que ocurre ocasionalmente durante las primeras etapas de la asociación. La base molecular del reconocimiento y discriminación celular se muestra en la **Figura 7**.

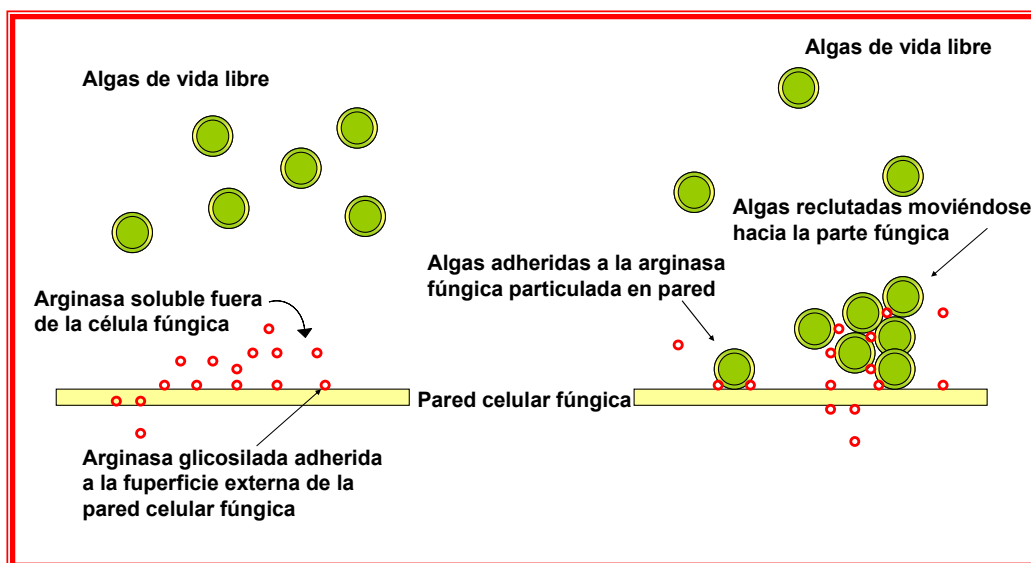


Figura 7. Esquema de la base molecular del reconocimiento y discriminación celular entre alga y hongo basado en dos clases de lectinas producidas por el micobionte, las particuladas en pared y las solubles encargadas del reclutamiento de posibles algas compatibles.

4.3. Naturaleza del ligando de la lectina

La unión de la lectina fúngica a su ligando de pared en el alga implica un mecanismo de afinidad entre algunos restos aminoacídicos de la lectina y residuos específicos de azúcares de la mitad glicosilada del ligando (Fontaniella *et al.*, 2004, Legaz *et al.*, 2003) que, en *Evernia prunastri* se trata de una cadena de poligalactosa unida a un polipéptido con actividad ureasa (Pérez-Urria y Vicente, 1989). Este mecanismo es muy similar a otros descritos para otras lectinas de diferentes orígenes (Min *et al.*, 1992). Además, la unión de esta lectina a su ligando da lugar a una completa pérdida de ambas actividades enzimáticas, arginasa y ureasa (Molina y Vicente, 1993).

Sin embargo, la naturaleza del enlace químico entre las unidades de galactosa en el ligando es todavía desconocida. Su estudio podría abordarse tratando a los clorobiontes con enzimas α - o β -galactosidasas relacionando la pérdida ocasional de la capacidad de unión de la lectina al ligando con la total o parcial hidrólisis enzimática del resto de poligalactosa del receptor. Estas hidrolasas no solo rompen el enlace glicosídico de disacáridos (lactosa, melbiosa) o tri- y tetrasacáridos (rafinosa, estaquiosa) conteniendo galactosa. Los galactomananos, por ejemplo, liberan

galactosa tras la incubación con la α -galactosidasa de tomate (Pressey, 1984) dado a que hidrolizan específicamente los residuos terminales α -D-galactosa no reductores en α -D-galactósidos (Tulsiani *et al.*, 1995). La β -galactosidasa cataliza una glicoproteína aglutinina de cacahuete liberando galactosa a partir de galactosil-fetuina (Shibuya *et al.*, 1999). Por tanto, puede esperarse que la incubación de los clorobiontes de *Evernia* con α - o β -galactosidasa producirá la desgalactosilación de las proteínas de superficie de pared celular con restos galactosa.

5. LOS LÍQUENES PUEDEN PRODUCIR ISOFORMAS DE ARGINASAS GLICOSILADAS CON CARÁCTER DE LECTINAS

X. parietina no sólo produce la arginasa glicosilada en pared denominada ABP, sino que también la segrega tras incubaciones sobre tampón realizadas en oscuridad. En luz, talos flotados sobre tampón segregan otra arginasa glicosilada, denominada SAX, que ha sido purificada a homogeneidad, obteniéndose una masa molecular de 58 kDa en SDS-PAGE. Los datos obtenidos del análisis de ambas isoformas por electroforesis capilar indican que en ambos casos se trata de proteínas ácidas, siendo el pI de ABP igual a 3.53 mientras que el pI correspondiente a SAX era 4.54 (Molina *et al.*, 1997).

En *Evernia prunastri*, la arginasa es una enzima inducible por sustrato cuando el talo es incubado en oscuridad (Legaz y Vicente, 1980), aunque también es activa en luz. La urea se comporta como un inhibidor competitivo de la enzima, con un valor de K_i de 2,58 mM, mientras que la agmatina es un inhibidor no competitivo ($K_i = 21,54$ mM). El aminoácido L-ornitina y la diamina putrescina estimulan la actividad arginasa, mientras que la urea inhibe mediante un mecanismo de retroinhibición, que asegura un completo y efectivo control de la enzima (Vicente y Legaz, 1983).

En este mismo líquen también se ha caracterizado una forma constitutiva de arginasa, preexistente e inactiva hasta que la arginina es liberada al citosol tras la hidratación del talo, probablemente secuestrada antes en vacuolas (Legaz y Vicente,

1982). Presenta una masa molecular de 330 kDa, una cinética de saturación típicamente micaliana con una K_m para la L-arginina de 2,50 mM. L-ornitina, agmatina y putrescina son activadores no esenciales de la enzima. Ambas formas de arginasa, inducible y constitutiva, requieren Mn^{2+} de modo específico como cofactor.

La tercera forma de arginasa es una glicoproteína que se libera al medio. Contiene 280 residuos de glucosa, 27 de fructosa y 85 de manosa por molécula de proteína. Su K_m es de 1,50 mM para L-arginina y se activa por ácido úsnico (Planelles y Legaz, 1987).

Estas tres formas de arginasas, con una masa molecular tan elevada, se corresponden con los distintos estados de agregación de la enzima, como ha sido demostrado posteriormente al aislar y purificar cuatro isoformas distintas de arginasa en *E. prunastri* (Pedrosa, 1993). Las isoformas I y II: intratalinas e inducibles con masas moleculares de 18 y 16 kDa, respectivamente; la isoforma III, constitutiva con una masa molecular de 26 kDa; y una última isoforma IV glicosilada, inducible y segregable, de 20 kDa. La composición aminoacídica es muy similar predominando el triptófano, pero con valores distintos de pI, según el estudio en electroforesis capilar (**Tabla III**).

Probablemente, las diferentes afinidades de estas lectinas por su ligando puedan ser explicadas sobre la base de la microheterogeneidad encontrada para las diferentes arginasas en electroforesis capilar dependiendo de la concentración del tampón y de su pH (Pedrosa y Legaz, 1995). La microheterogeneidad es principalmente debida a cambios conformacionales provocados por diferentes tensiones iónicas y diferentes valores de pH, que exponen diferentes residuos de aminoácidos en la superficie de la proteína y, por tanto, su capacidad de unirse a un ligando puede ser profundamente modificada.

Tabla III. Algunas propiedades bioquímicas de las cuatro isoformas de la arginasa de *Evernia prunastri* que se corresponden con los estados de agregación de la enzima.

	Masa Molecular (kDa)	K _M (mM)	Inhibida por	Activada por	pI	Número de monómeros
Isoforma I (Inducible)	18	1,5	urea agmatina ácido evérnico	ornitina putrescina	5,86	10
Isoforma II (Inducible)	16	1,5	urea agmatina ácido evérnico	ornitina putrescina	5,83	10
Isoforma III (constitutiva)	26	4,5	exceso de sustrato	ornitina putrescina agmatina ácido evérnico	6,18	12
Isoforma IV (glicosilada)	20	4,45	exceso de sustrato	ácido úsnico	5,60	12

6. BASES BIOQUÍMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE LA INCOMPATIBILIDAD

El punto de partida para el estudio de la incompatibilidad de las algas frente a un micobionte determinado debería implicar que la compatibilidad esté basada en la unión de la lectina fúngica al ligando de pared celular del alga, ligando definido como receptor específico de la lectina.

6.1. Bases estructurales de la incompatibilidad

La hipótesis de trabajo construida sobre estas bases supone que la entrada de una lectina en el interior de una célula que no ha producido previamente su ligando específico tendrá efectos perjudiciales sobre dicha célula. Para verificar esta hipótesis se han planteado diferentes experimentos. Células del clorobionte de *X. parietina*

mantenidas durante 7h 30 min en tampón fosfato y consideradas como células control muestran un cloroplasto único que contiene multitud de lamelas alineadas en paralelo, ocupando una gran proporción del área total del cloroplasto. Unos pocos plastoglóbulos periféricos fueron también detectados, así como un pirenoide perfectamente diferenciado, ocupando una posición central en el cloroplasto.

La observación de células cebadas con arginina y mostrando actividad ureasa en sus paredes, inducida mediante una incubación previa sobre urea, y puestas posteriormente en contacto con ABP revelan solo una incipiente plasmolisis como único cambio estructural, probablemente debida a la preincubación de las células en urea. Las lamelas y pirenoglóbulos aparecen perfectamente diferenciados, formando estos últimos un pirenoide central. También pueden observarse pequeños plastoglóbulos como formaciones periféricas dentro del cloroplasto.

No obstante, una plasmolisis de mayores dimensiones puede ser observada después de cebar con arginina células que no contienen ureasa en sus paredes celulares y ponerlas después en contacto con ABP. Además de esta plasmolisis, el cloroplasto se había vuelto más pequeño, el sistema lamelar aparecía desorganizado y el pirenoide destruido aunque, en algunos casos, unos pocos pirenoglóbulos dispersos permanecían intactos tras el tratamiento. Aparecían grandes cuerpos membranosos en el interior del cloroplasto mientras que los cuerpos de almacenamiento disminuían en número y aumentaban en tamaño en relación con los equivalentes observados en las células control o en aquellas que fueron capaces de retener la lectina adsorbida sobre la cara externa de sus paredes celulares (Molina y Vicente, 1995). Todos estos cambios venían relacionados con un blanqueamiento general de las células.

Ya que en *X. parietina* se han identificado dos arginasas glicosiladas diferentes, su capacidad para unirse a los clorobiontes de *Xanthoria* fue ensayada por Molina y Vicente (1995) usando las lectinas no marcadas y marcadas con ITCF. Esta capacidad era comparativamente mayor para SAX que para ABP. Esto podría interpretarse en términos de diferente afinidad de cada una de las lectinas por los monosacáridos componentes de la mitad glicosídica de un mismo ligando. También se demostró que

una considerable cantidad de fluorescencia proveniente de ITCF-SAX entraba en el interior de células que no habían inducido el correspondiente ligando.

ABP, SAE y SAX exhiben actividad arginasa Mn^{2+} -dependiente. Ca^{2+} no supe la ausencia de Mn^{2+} , y la adición de Ca^{2+} a las mezclas de reacción en presencia de Mn^{2+} inhibe significativamente la actividad arginasa de ambas enzimas segregadas (Legaz *et al.*, 2004). No obstante, la adición simultánea de Ca^{2+} y Mn^{2+} a los medios de incubación de clorobiontes aislados de talos de *E. prunastri* y *X. parietina* incrementa fuertemente la eficiencia de la unión de las lectinas marcadas a la pared celular de las algas cuando una actividad ureasa ha sido previamente detectada ligada a dicha estructura. Esto estaría de acuerdo con la dependencia de Ca^{2+} para la unión de la lectina a su ligando (Zhu-Salzmman *et al.*, 2002).

La unión ocurre tanto en algas homólogas como heterólogas. Esto conduce a que SAE pueda unirse eficientemente a clorobiontes de *Evernia*, pero que también sea capaz de unirse a clorobiontes de *Xanthoria*. Recíprocamente, SAX se une preferentemente a clorobiontes de *Xanthoria* pero también interacciona con las paredes celulares de algas obtenidas de *Evernia*, lo que sugiere un cierto grado de inespecificidad. Es muy interesante notar que el único requerimiento para que se dé el ligamiento es la existencia de ureasa poligalactosilada en la pared celular tanto de algas homólogas como heterólogas. La unión de SAE y SAX a sus ligandos puede ser revertida por galactosa (Legaz *et al.*, 2004) en cualquier condición, lo que claramente define que residuos galactosa están envueltos en la unión específica.

6.2. Bases metabólicas de la incompatibilidad

La entrada de una lectina con actividad arginasa en una célula incompatible, es decir, en una célula que no contiene en su pared ligando para dicha lectina, debería cambiar el título de las poliaminas en el interior celular. Por ello, Molina y Vicente, 1995, analizaron el contenido relativo de las diferentes poliaminas en los distintos tratamientos a los que los clorobiontes de *Xanthoria* habían sido sometidos.

El contenido inicial en putrescina libre (S-PUT) de algas recientemente aisladas de los talos recién recolectados era relativamente bajo, $15 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco. El contenido en S-PUT no era afectado por la adición de ABP o SAX a las células de algas aisladas. Cuando estas células fueron cebadas por incubación sobre arginina 28 mM durante 30 min, la concentración del aminoácido en el interior de las algas aumentó desde $76 \mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco a $226 \mu\text{mol g}^{-1}$. Este cebado de los clorobiontes de *Xanthoria* con arginina exógena de alguna manera simula una posible situación en la cual una parte de la inusualmente alta cantidad de arginina libre en el talo (Legaz *et al.*, 1986) pueda ser translocada al alga tras la rehidratación de la muestra. Este cebado con arginina eleva la cantidad de S-PUT después de la adición a los clorobiontes de ABP o SAX. Esto implica que la arginina, que sería lentamente descarboxilada en el alga por una arginina descarboxilasa (ADC), sería ahora rápidamente hidrolizada por la arginasa añadida (ABP o SAX), no detenida en la superficie celular por falta de ligando inducido.

La afinidad de la arginasa por arginina es del orden de 60 veces más alta que la afinidad de la ADC por el mismo aminoácido (Vicente y Legaz, 1981; Legaz y Vicente, 1982). Este cambio en el título de S-PUT solo puede ser posible gracias a la actividad coadyuvante de la arginasa (lectina) fúngica, que penetraría en el interior de las células del clorobionte que no posean el ligando específico para dicha lectina en sus paredes celulares. Consecuentemente, la adición de ABP o SAX a clorobiontes con ureasa de pared inducida previamente produce un ligero decrecimiento en la cantidad de S-PUT. No se ha encontrado SH-PUT (putrescina conjugada soluble en ácido) en cantidades significativas, en ninguno de los tratamientos. Con respecto a la fracción PH-PUT (putrescina conjugada insoluble en ácido) solamente incrementa su concentración tras la adición de SAX a células del alga previamente cebadas con arginina exógena.

7. LAS ALGAS INCOMPATIBLES SON ELIMINADAS MEDIANTE UN PROCESO DE MUERTE INDUCIDA

Los acontecimientos que se desarrollan en paralelo a la acumulación de S-PUT después de la entrada de ABP o SAX en células de clorobiontes que no contienen ureasa glicosilada en su pared celular han sido estudiados por Microscopía Electrónica de Transmisión.

Se han podido observar algunos daños ultraestructurales: aparición de grandes espacios periplásmicos, pérdida de material citoplásmico, deterioro de la membrana plasmática, compactación de las membranas tilacoidales, desaparición del pirenoide, etc. Cuando se usa en este estudio ultraestructural un sistema de detección de polisacáridos mediante la técnica PATAg (Ácido Periódico-Tiocarbohidrazida de Plata), los espacios periplásmicos de las células tratadas tanto con ABP como con SAX contienen grandes cantidades de polisacáridos así como materiales de membrana. Además, pudieron observarse vesículas secretoras que contenían polisacáridos, así como abundantes cuerpos vesiculares (**Fig. 8**).

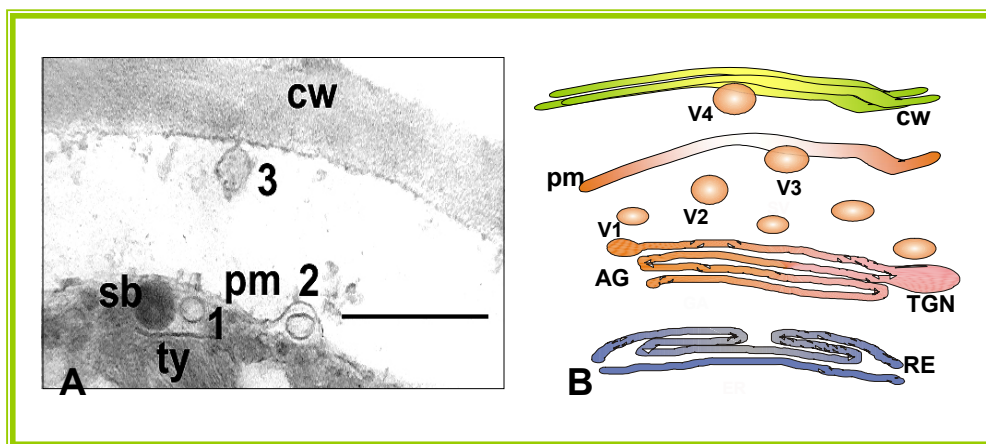


Figura 8. Efectos de la lectina fúngica sobre clorobiontes aislados de *X. parietina* sin el ligando de pared inducido, células incompatibles. A) Amplificación de la zona periplásmica de dichos clorobiontes donde las vesículas secretoras (1, 2 y 3) conteniendo polisacáridos migran hacia el espacio apoplásmico en un intento de reconstruir la estructura desorganizada de la pared. B) Esquema de la formación de vesículas secretoras desde la TGN en el Aparato de Golgi migrando hacia la pared celular de los clorobiontes para secretar macromoléculas sobre su cara interna. (cw= pared celular, pm= membrana plasmática, sb= cuerpos de almacenamiento, RE= Retículo Endoplásmico, TGN= Red Trans Golgi, AG= Aparato de Golgi, V1= vesículas jóvenes, V2= vesículas con membrana reorganizada, V3= vesículas con polisacáridos concentrados, V4= vesículas en exocitosis).

La aparición de estas vesículas ha sido interpretada como un intento por parte de la célula de reparar los daños inducidos en las paredes celulares, que podrían finalmente ser rotas y acaecer entonces la muerte de la célula. Este intento de reparación de la pared dañada, una especie de mecanismo de resistencia frente al ataque fúngico, requiere no solamente la producción de microfibrillas de celulosa en la superficie de la membrana plasmática, sino también la síntesis de polisacáridos no celulósicos en el sistema de Golgi. De esta forma, el material empaquetado en el interior de estas vesículas puede integrarse en la pared celular con las microfibrillas celulósicas nuevamente sintetizadas (Molina *et al.* 1998a).

No obstante, este mecanismo de resistencia no suele tener éxito, ya que el número de células muertas es mayor después de la entrada de las arginasas glicosiladas fúngicas en el interior de las algas que no poseen el ligando inducido en su pared celular. Para clarificar el final del proceso, se valoró la actividad glucanasa de los extractos acelulares de clorobiontes de *X. parietina* recientemente aislados de sus correspondientes talos. En aquellas células incubadas con SAX se observó un fuerte incremento de la actividad enzimática, de modo que la lectina penetra en las células del alga y estas desarrollan 5 veces más actividad glucanasa que aquellas que no habían sido tratadas con la lectina (Molina *et al.*, 1998b).

Ya que ha sido demostrado que la cantidad de S-PUT incrementa después de la entrada de SAX en las células, sería entonces posible relacionar el incremento en la actividad glucanasa con el incremento de la concentración de S-PUT. Para ello, alícuotas de un extracto libre de células preparado a partir de algas recientemente aisladas fueron suplementadas con putrescina hasta alcanzar una concentración final en mezcla que variaba desde 1,0 mM a 10 mM. Después de 3h de incubación, pudo observarse que la putrescina activaba fuertemente la glucanasa *in vitro*. Estos resultados podrían explicar la activación de la glucanasa del alga observada después de la entrada de la lectina en las células (**Fig. 9**).

De acuerdo con las teorías de coevolución y virulencia (Ahmadjian, 1987), los efectos perniciosos producidos por un hongo frente a su alga teóricamente compatible pueden ser drásticos después de un corto tiempo de contacto físico (**Fig. 9**). Esto

implicaría una acción química muy rápida antes que una invasión física, difícil dado el lentísimo crecimiento del micobionte para producir haustorios.

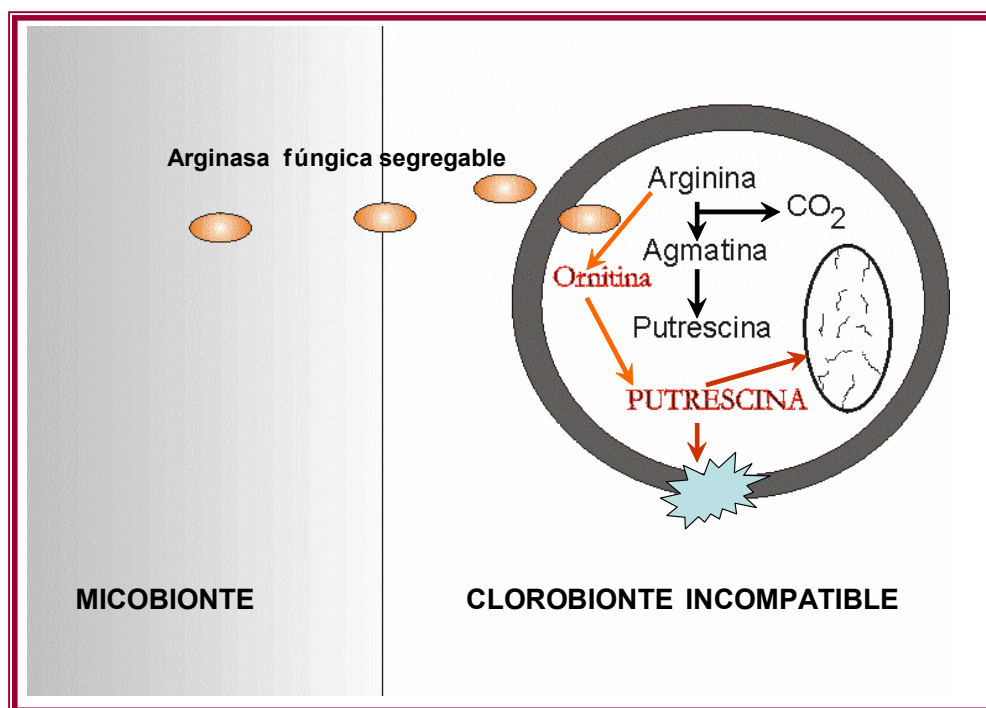


Figura 9. Esquema de la incompatibilidad entre simbios. La actividad glucanasa se ve incrementada como consecuencia de la entrada de la lectina fúngica en el clorobionte vía hidrólisis de arginina y aumento de la concentración de putrescina en el interior celular.

La activación de las glucanasas del alga como una acción indirecta de la arginasa fúngica al aumentar los niveles de putrescina libre está claramente relacionada con la hidrólisis de distintas capas celulósicas de la pared celular del alga, visualizada por microscopía electrónica de transmisión (Molina *et al.*, 1998b). Finalmente, la pared celular, profundamente dañada, deja escapar el protoplasto (**Fig. 10**), que se rompería en un ambiente exterior hipotónico, muriendo de esta manera la célula.

Ya que la unión de la lectina a su ligando en la pared celular del alga puede llevarse a cabo incluso en un talo en crecimiento como una vía de reconocer nuevos compañeros compatibles, surgidos de la división de células madres liquenizadas, es

posible que la misma lectina pueda ser utilizada para prevenir la producción de un número de clorobiontes superior al requerido para mantener la asociación equilibrada. El micobionte podría ser, quizá, capaz de eliminar células viejas que fuesen incapaces de producir el ligando de la lectina. De esta forma, el micobionte controlaría de manera eficiente el tamaño de la población de clorobiontes desarrollando un mecanismo de muerte celular programada.

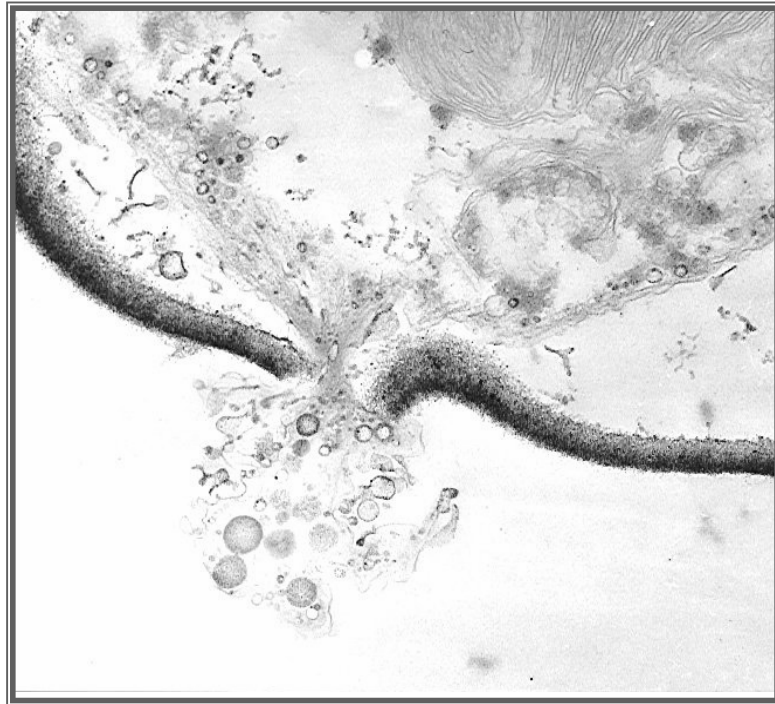


Figura 10. Detalle por Microscopía Electrónica de Transmisión de la pérdida de material citoplásmico de clorobiontes de *X. parietina* a través de un poro producido por acción de glucanasas activadas por putrescina, último efecto de la entrada de la arginasa en el interior de una célula sin receptor de pared celular (tomada de Molina *et al.*, 1998b).

8. A MODO DE PREDEFINICIÓN DE UN ALGA COMPATIBLE

De acuerdo con todos los hechos descritos hasta ahora, podría afirmarse que una célula de un alga será reconocida como compatible cuando la lectina fúngica se una a un ligando específico en la pared celular de dicha alga. Este supuesto ha sido estudiado usando clorobiontes de *X. parietina* y ABP marcada con ITCF, con un máximo de emisión de fluorescencia a 512 nm y un máximo de excitación a 468 nm. En ningún caso fue detectada emisión de autofluorescencia de las paredes de las algas control no tratadas y mantenidas en tampón fosfato para dicha longitud de onda (Molina y Vicente, 1995). Sin embargo, cuando ITCF-ABP fue primero adsorbida sobre células del clorobionte recién aisladas e incubadas durante 4h sobre urea 100 mM, alrededor del 50% de la fluorescencia total adsorbida fue desorbida por lavado de las células con galactosa 50 mM.

No se conseguía llevar a cabo esta desorción cuando las células recién aisladas, sin ninguna incubación previa, fueron puestas en contacto con ITCF-ABP, aunque un alto porcentaje de fluorescencia desapareciera del sobrenadante después del contacto de la lectina con las células. En este caso, la fluorescencia desaparecida era completamente recuperada después de romper las células con ultrasonidos, lo que indicaba que la lectina fluorescente estaba localizada en el interior de unas células que no habían inducido el ligando apropiado y, por tanto, dicho ligando estaba ausente de sus paredes celulares.

La compatibilidad del alga viene entonces definida por la ausencia de cambios metabólicos y estructurales en algas que han impedido la entrada en su interior de una arginasa fúngica, secuestrándola en la cara externa de sus paredes celulares por un mecanismo de afinidad lectina-ligando (**Fig. 11**). Esto supondría, como hipótesis de trabajo, que cualquier alga capaz de producir una ureasa convenientemente glicosilada, transitoria o permanentemente localizada en la pared celular, podría ser reconocida como compatible con independencia de su posición filogenética.

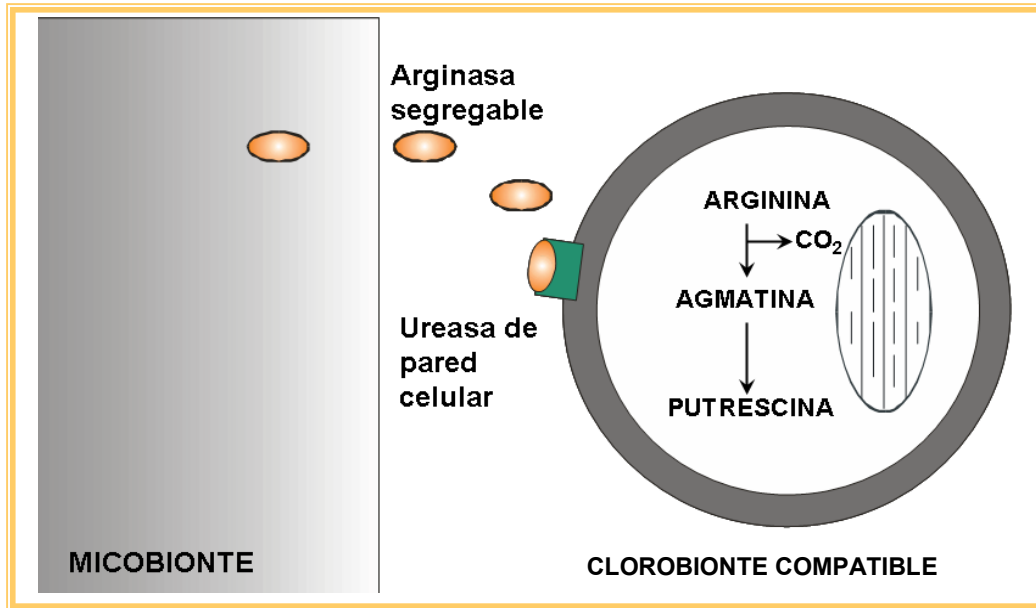


Figura 11. Esquema de la compatibilidad entre simbiontes. La lectina fúngica es retenida en la superficie exterior celular del clorobionte compatible y por tanto hay ausencia de cambios estructurales o metabólicos.

Ya se ha dicho que, al igual que las lectinas de leguminosas y de otros orígenes, las lectinas de los líquenes producen hemaglutinación. De idéntica forma, tanto SAE como SAX y ABP son capaces de inducir agregación celular cuando se ponen en contacto con células compatibles en suspensión. Legaz *et al.* (2004) demostraron que esta citoaglutinación puede darse incluso para algas heterólogas respecto al origen de la lectina cuando el ligando de pared, ureasa poligalactosilada, ha sido previamente inducido. El sentido fisiológico de este reclutamiento celular parece claro. Las probabilidades de éxito en el contacto entre micobionte y clorobiontes compatibles aumentarán en función directa del número de células contactadas, lo que previene los efectos negativos derivados de un cierto porcentaje de muerte celular tras el contacto inicial.

9. ESTABILIDAD DEL CLOROPLASTO

La incompatibilidad entre alga y hongo, entendida como la falta de la expresión del ligando de pared en el fotobionte, lleva consigo una acumulación de poliaminas en el interior celular y una desorganización estructural del cloroplasto como consecuencia del acceso libre de la arginasa a la célula. Las bases estructurales y metabólicas de la incompatibilidad han sido establecidas previamente en distintos trabajos (Molina y Vicente, 1995; Molina *et al.* 1998a; Molina *et al.* 1998b; Legaz *et al.*, 2004).

En la presente memoria se aborda el estudio del daño a nivel funcional en el cloroplasto en correlación con la entrada de dicha arginasa en las algas y con el aumento del título interior de putrescina a través del análisis de la actividad fotosintética y de los complejos clorofila-proteína aislados de fotobiontes carentes o no del ligando de pared y en presencia de concentraciones crecientes de putrescina mediante electroforesis capilar y en gel de poliacrilamida.

Varios trabajos muestran esta correlación. Guarino y Cohen (1979) encontraron que una cantidad de putrescina elevada causaba la muerte de cianobacterias. Vicente y Legaz (1983) dieron cuenta del rápido blanqueamiento ocurrido en el talo de *E. prunastri* tras la adición de putrescina exógena al medio de cultivo. Cheng *et al.* (1984) observaron la degradación de la clorofila en luz mediante poliaminas en hojas de arroz desprendidas.

De la misma manera se realizaron los espectros de absorbancia y fluorescencia correspondientes dando idea de su actividad fotosintética. Según Krause y Weis (1984), la clorofila puede considerarse como una sonda fluorescente intrínseca del sistema fotosintético. En la hoja de una planta o en la célula de un alga, el rendimiento de fluorescencia está influido de manera muy compleja por muchos acontecimientos que, directa o indirectamente, están relacionados con la fotosíntesis.

La función indicadora de la fluorescencia de la clorofila proviene del hecho de que la emisión de fluorescencia es complementaria a otras rutas alternativas de desexcitación que son principalmente la fotoquímica y la disipación del calor. Generalmente, la producción de fluorescencia es mayor cuando la fotoquímica y la disipación del calor son menores, dado que estos tres procesos entran en competición

(Maxwell y Johnson, 2000). Por tanto, los cambios en la fluorescencia se reflejan por cambios en la eficiencia fotoquímica y la disipación del calor (Fracheboud, 2004). La señal experimental de fluorescencia de una muestra es, por tanto, determinada por una relación de constantes de estas reacciones en competición y por la fracción de los centros de reacción abiertos, que son los que contribuyen a la desexcitación fotoquímica (Krause y Weis, 1984).

En concreto, Maxwell y Jhonson (2000), afirman que la fluorescencia de la clorofila da información sobre el estado del fotosistema II, ya que mide su eficiencia fotoquímica y puede ser indicativo de la tasa general de fotosíntesis.

La mayoría de los estudios para la caracterización de complejos proteicos de cloroplastos de algas tienen en común el requerimiento previo de la solubilización de las membranas tilacoidales en presencia de bajas concentraciones de SDS, a menudo en combinación con detergentes no iónicos (Anderson, 1983; Nakayama *et al.*, 1986). El uso de SDS es un prerequisite para la separación de complejos hidrofóbicos mediante electroforesis en gel, ya que este detergente iónico introduce carga en las proteínas. La determinación del estado oligomérico de las proteínas de membrana es difícil debido a su tendencia a agregarse cuando están aisladas del ambiente nativo de la membrana. Además, la unión de detergentes a las superficies hidrofóbicas aumenta el total de la masa proteica (Kantzilakis *et al.*, 2007).

Los perfiles electroforéticos de las membranas tilacoidales de las algas verdes *Codium* y *B. maxima* daban ocho y siete bandas, respectivamente, mientras que las membranas tilacoidales de plantas superiores como espinaca y cebada, fueron resueltas en seis bandas (Anderson, 1980). Melis y colaboradores (1987) describieron la composición de los fotosistemas de espinaca mediante el análisis de los complejos clorofila-proteína mediante PAGE-SDS bajo condiciones no desnaturizantes (Anderson, 1980; Andersson y Anderson, 1980) y el complejo del centro de reacción del fotosistema II fue aislado utilizando un 1-O-n-octil- β -D-glucopiranosido (Ikeuchi *et al.*, 1985). El detergente octil- β -D-glucopiranosido extrae preferentemente complejos que contienen proteína y clorofilas a y b en espinaca, dejando un residuo altamente enriquecido en proteína P700 asociada a clorofila a (Camm y Green, 1980).

Métodos convencionales de extracción en detergente, geles no desnaturalizantes y PAGE dissociativa fueron usados para separar complejos de proteínas unidas a clorofila de *Acaryochloris marina* (Chen *et al.*, 2002). Tres complejos clorofila-proteína fueron aislados de las membranas tilacoidales de las algas verdes marinas *Bryopsis maxima* y *Ulva pertusa*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil- β -D-maltósido (Yamazaki *et al.*, 2006). Kantzilakis y colaboradores (2007) aislaron los complejos clorofila-proteína del alga verde *Scenedesmus obliquus* mediante solubilización con dodecil- β -maltósido y fraccionamiento por gradiente de sacarosa. Las fracciones conteniendo Chl-proteína se caracterizaron por espectroscopia de absorción, SDS-PAGE en presencia de tricina, BN-PAGE y DLS (Dynamic Light Scattering).

10. MECANISMOS DE RECONOCIMIENTO EN CIANOLÍQUENES

El 10% de los líquenes tiene una cianobacteria como fotobionte, aunque algunos líquenes con alga verde pueden tener también cianobacterias en cefalodios, estructuras especiales en la superficie del liquen que sirven probablemente para facilitar la fijación de nitrógeno atmosférico que llevan a cabo las cianobacterias.

Cianobiontes potenciales de vida libre, como *Nostoc*, producen hormogonios (filamentos cortos de una variedad de cianobacterias productoras de heterocistos) antes de intentar una relación simbiótica. La liberación de los hormogonios es inducida por la combinación de una cierta variedad de condiciones biológicas y ambientales, tales como una depresión en la disponibilidad de nitrógeno combinado, un exceso de hierro o de fosfatos, el cambio de luz blanca a luz roja, o mediante señales transmitidas por un factor de inducción de hormogonios (HIF) producido por el huésped potencial (Meeks y Elhai, 2002). Los hormogonios libres y móviles desarrollan quimiotaxis hacia el huésped productor de quimioattractantes de tal manera que puedan ser reconocidos a su entrada en el huésped por factores de reconocimiento de hormogonios (HRF), también producidos por el huésped (Bergman *et al.*, 1993).

Rikkinen (2002) ha descrito un modelo para la transducción de señales entre simbiontes en cianolíquenes. Se conocen dos tipos de elicitores de señal: elicitores generales, sin mayores diferencias en sensibilidad entre los organismos que responden a la señal, y elicitores específicos, que funcionan según vías diferentes. Los elicitores generales suelen ser sustancias asociadas al metabolismo primario e incluyen glucanos, oligómeros de quitina, glicopéptidos, fragmentos de paredes celulares y muchos fenoles.

Los elicitores específicos pueden incluir proteínas, péptidos, sirincólidos y compuestos fenólicos. No obstante, no existe ninguna evidencia experimental conocida acerca de la implicación de los fenoles de líquenes en el reconocimiento de fotobiontes compatibles y además, los cianolíquenes no producen fenoles específicos. El reconocimiento celular de moléculas disparadoras de señal implica proteínas transmembrana, la parte intramembrana, que debe funcionar como una proteína quinasa, y moléculas transmisoras hacia los mecanismos celulares que dan como resultado respuestas interbióticas (**Fig. 12**). Desafortunadamente, no se han publicado todavía pruebas experimentales que confirmen este mecanismo.

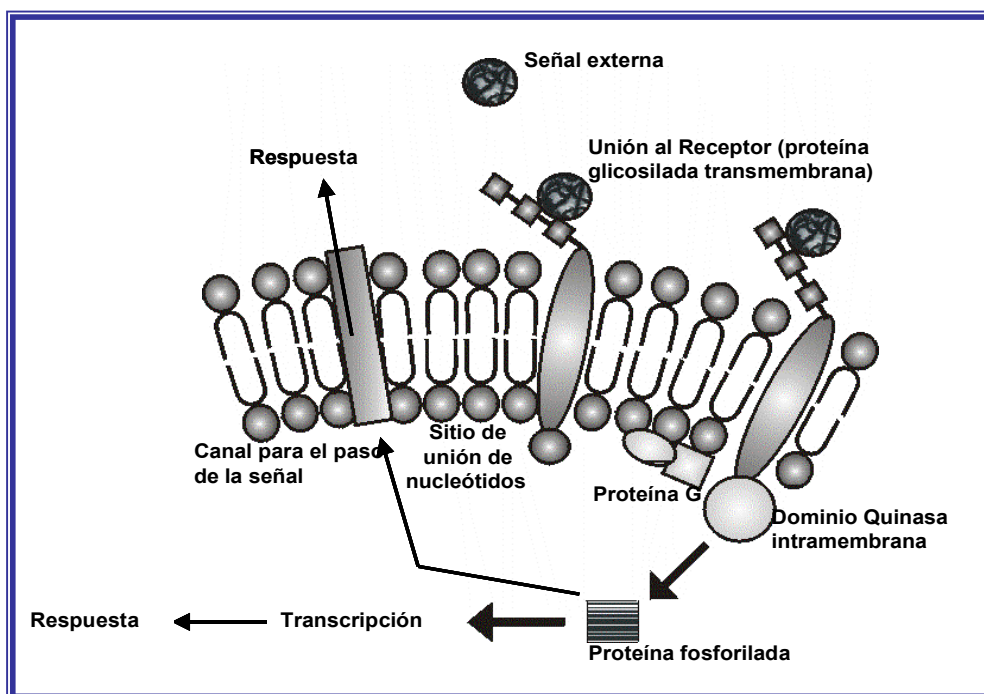


Figura 12. Esquema del proceso de reconocimiento de cianobacterias por micobiontes compatibles, según Rinkinen (2002).

El reconocimiento de un cianobionte compatible puede ser llevado a cabo también por lectinas. En hepáticas y briófitas, la planta produce lectinas que reconocen residuos de azúcares en la superficie celular de un *Nostoc* pre-simbiótico (Bergman *et al.*, 1993). Kardish y colaboradores (1991) estudiaron la unión de una lectina aislada del micobionte de *Nephroma laevigatum* a células de *Nostoc* de diferentes orígenes y concluyeron que estas proteínas estaban envueltas en el control y procesos regulatorios del balance simbiótico en el talo del liquen. También se han aislado lectinas del micobionte de algunas especies de *Peltigera* (Lehr *et al.*, 1995; Rai *et al.*, 2000). En *P. aphthosa*, una lectina es capaz de reconocer células compatibles de *Nostoc* en el inicio de la formación de cefalodios, siendo este proceso altamente específico (Lehr *et al.*, 2000). La especificidad para el cianobionte ha sido confirmada en un estudio más reciente en el que se pretendían inocular cepas extrañas de *Nostoc* en los cefalodios de *P. aphthosa* (Paulsrud *et al.*, 2001).

En la presente memoria se estudia la posibilidad de hacer extensivo el patrón de reconocimiento de algas verdes por parte de los hongos liquenizados a líquenes que contienen cianobacterias como fotobiontes. Para ello se aisló la arginasa de *Leptogium corniculatum*, con *Nostoc* como cianobionte, y fue utilizada en distintas pruebas de ligamiento con su propio ligando de pared y con aquel aislado del cloroliquen *E. prunastri*.

11. LAS PAREDES CELULARES DE LAS ALGAS LIQUENIZADAS CONTIENEN MÚLTIPLES LIGANDOS PARA DIFERENTES LECTINAS

Como se ha dicho, especies de líquenes que contienen cianobacterias como fotobiontes específicos también producen lectinas que desarrollan afinidad por polisacáridos que contienen galactosa. Lehr *et al.* (1995) purificaron una de tales lectinas a partir de *Peltigera membranacea* y, más tarde, otra de cefalodios de *P. aphthosa* (Lehr *et al.*, 2000). Esta última fue caracterizada como una glicoproteína con una masa molecular de 20 kDa, desarrollando alta actividad citoaglutinante que era revertida por adición de lactosa a la suspensión celular. No obstante, la reactividad de varios cianobiontes liquénicos frente a lectinas de leguminosas fue demostrada por Marx y Peveling (1983).

La lectina marcada de *Canavalia ensiformis*, FITC-ConA, se une eficientemente a las paredes celulares de clorobiontes de *E. prunastri* y *X. parietina*. La presencia de Ca^{2+} y Mn^{2+} durante la incubación de las células con la lectina marcada incrementa de forma significativa la unión de FITC-ConA a su receptor de pared celular. No obstante, la fluorescencia retenida por las células era recuperada en el sobrenadante después de tratar las células marcadas con α -metil-manopiranosido y después recogidas por centrifugación. Por otra parte, la fluorescencia no era recuperada a partir de células marcadas cuando éstas eran incubadas con galactosa, el azúcar reconocido por lectinas de líquenes (Fontaniella *et al.*, 2004). ConA comercial desarrollaba baja pero significativa actividad arginasa cuando el valor de actividad obtenido era comparado con el desarrollado por la misma masa de SAX purificada. Esta actividad enzimática también era dependiente de Mn^{2+} , catión que no podía ser sustituido por Ca^{2+} . Además, Ca^{2+} inhibía significativamente la actividad arginasa Mn^{2+} -dependiente. Sin embargo, la acción inhibitoria del Ca^{2+} sobre la hidrolasa Mn^{2+} -sensible fue varias veces más alta para SAX purificada. Esto sugiere diferencias estructurales entre ConA y SAX en la conformación del sitio de unión para Mn^{2+} .

La búsqueda de un ligando específico para manosa en las paredes celulares de clorobiontes de *Evernia* y *Xanthoria* mediante cromatografía de afinidad sobre un lecho de agarosa activada a la cual se había unido ConA dio como resultado la caracterización de una única proteína, diferente de la ureasa poligalactosilada, caracterizada previamente como ligando de las lectinas propias de ambas especies de líquenes, que, lógicamente, no desarrollaba actividad ureasa (Fontaniella *et al.*, 2004). Por otra parte, una nueva lectina ha sido aislada a partir de un extracto acuoso de *Dictyonema glabratum* y su cianobacteria *Scytonema* sp (Elifio *et al.*, 2000). La lectina es una glicoproteína con un grado de glicosilación bajo con enlaces N- y O-. Su ligando contiene N-acetilglucosamina como el monosacárido más activo en la relación de afinidad.

El hallazgo de dos lectinas, como las de *E. prunastri* y *X. parietina*, con la misma función y actividad enzimática, invita a analizar sus secuencias aminoacídicas y estudiar las posibles homologías que establezcan identidad de función para ambas proteínas producidas por dos especies líquénicas no relacionadas filogenéticamente.

12. EXTENSIÓN DEL MODELO DE RECONOCIMIENTO MEDIANTE HERRAMIENTAS MOLECULARES

El reconocimiento entre arginasa, por parte fúngica, y ureasa glicosilada, por parte del alga, es la base de la relación simbiótica en clorolíquenes y en la actualidad se estudia la posibilidad de hacerlo extensivo a cianolíquenes (Díaz *et al.*, 2009; Vivas *et al.*, 2009). El abordaje de dicho reconocimiento a nivel génico ofrece la posibilidad de encontrar secuencias homólogas entre las distintas especies de líquenes y de esta manera llegar incluso a una clave universal que sirviera para explicar relaciones filogenéticas. Con este propósito, se ha intentado construir un oligonucleótido codificante de lectina fúngica que podría ser utilizado en ensayos de hibridación por PCR (Polymerase Chain Reaction) (**Fig.13**) con ADNs aislados de otros hongos liquenizados así como de algas. De esta manera sería posible justificar la ya observada unión cruzada de arginasas de unas especies de líquenes sobre las ureasas de pared de las algas de otras especies diferentes, véase el ejemplo de las lectinas de *E. prunastri* y *X. parietina* sobre sendas especies de algas, homólogas y heterólogas (Molina *et al.*, 1993).

La PCR es una técnica de Biología Molecular que permite obtener un número de copias de un fragmento de ADN particular amplificándolo a partir de un mínimo resultando más fácil el manejo posterior de ese fragmento (Saiki *et al.*, 1985). La base de esta técnica reside en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas para replicar hebras de ADN pasando por ciclos de altas y bajas temperaturas para separar las hebras de ADN recién formadas tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a la polimerasa para que vuelva a duplicarlas (**Fig. 13**).

La versatilidad de esta técnica la ha convertido en un método rutinario para cualquier trabajo molecular y su aplicación en la biología de la evolución ha contribuido en un importante progreso en la filogenia de los hongos liquenizados y no liquenizados mediante los datos obtenidos del ADN ribosomal de la subunidad pequeña (SSU ADN_r) (Gargas y Taylor, 1992a, Gargas *et al.*, 1995a, Lutzoni y Vilgalys, 1995; Wedin *et al.*, 1998). La mayoría de los estudios realizados en hongos formadores de líquenes se han facilitado mediante el diseño de cebadores específicos que no amplifican el ADN del alga (Gargas y Taylor, 1992b).

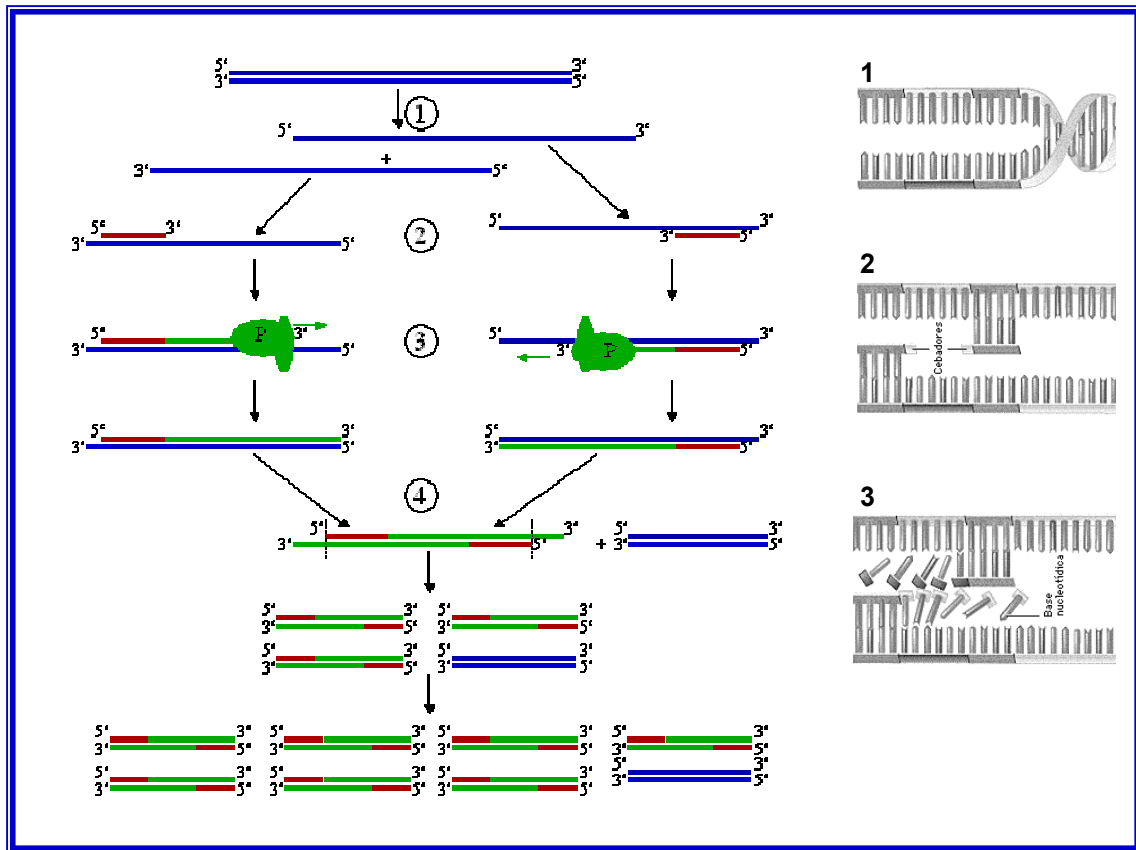


Figura 13. Esquema de las etapas de la PCR. (1) Desnaturalización: ADN molde en forma de cadena sencilla aplicando temperaturas de 90 a 95° C, lo que produce la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. (2) Hibridación: se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 a 60° C para que se pueda producir la unión de los cebadores (en rojo) a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. (3) Extensión: La polimerasa toma la cadena de ADN molde previamente desnaturalizado para sintetizar la cadena complementaria (en verde) incorporando los nucleótidos y parte del cebador como soporte inicial en extremo 3'. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser 72 +/- 5° C ya que es a este rango de temperatura en que la polimerasa alcanza su máxima actividad. (4) Elongación de todos los fragmentos formados a 72° C.

A partir de secuencias de ARNm de varias arginasas fúngicas publicadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank, se diseñaron varios cebadores específicos de micobiontes que no amplificaran ADN del alga (Gargas y Taylor, 1992b). Estas secuencias fueron alineadas para obtener una comparativa de los fragmentos más conservados y repetidos. De ellos se obtuvieron cuatro cebadores (dos externos y dos más internos en ambos sentidos) llamados “*Degenerate PCR primers*” para salvar los posibles cambios en las secuencias molde y aumentar las probabilidades de éxito en la combinación con el cebador. Son cebadores que tienen un cierto número de opciones en algunas posiciones de su secuencia para permitir la hibridación y amplificación de una variedad de secuencias relacionadas. Se

usan para amplificar secuencias conservadas de un gen o varios genes de un genoma de un organismo y para conseguir secuencias de nucleótidos tras haber secuenciado los aminoácidos de una proteína de interés (Compton, 1990). Además dichos cebadores tenían una temperatura de anillamiento alta para impedir los apareamientos al azar si existieran alteraciones en la secuencia de las partes conservadas de los genes, liquenizados o no. Esta temperatura podría bajarse para permitir la unión del primer si no llega a darse con una más alta.

Las reacciones de PCR se realizaron con todas las combinaciones posibles de cebadores usando como ADN molde aquel extraído de micobiontes aislados por cultivo, concretamente de *Lecanora muralis* y *X. parietina*. Se probaron diferentes temperaturas de anillamiento mediante la elaboración de gradientes de temperatura en la fase de hibridación recorriendo un rango desde los 50° C a 60° C para seleccionar después la temperatura que diera lugar a los productos más puros de PCR. Al ser cebadores elaborados químicamente pero no completamente específicos, se probaron igualmente distintas enzimas ADN polimerasas para dar con la más adecuada.

La obtención de distintos productos de PCR hizo necesario el clonaje de los mismos en células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5 α mediante transformación con el plásmido pCR[®] 4-TOPO[®] vector (Invitrogen) (**Fig. 14**) sometiendo a las células a un golpe de calor inicial (Hanahan, 1983). Dicho plásmido contiene en su secuencia, entre otros, dos genes que actúan como marcadores de selección. En primer lugar, un gen de resistencia al antibiótico Ampicilina (gen Amp^R). El otro gen es el gen lacZ que codifica para la enzima β -galactosidasa que degrada la lactosa y otros β -galactósidos como el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-galactósido (X-gal). Sin embargo, esta copia del gen del plásmido es defectuosa y, por tanto, el polipéptido producido tras la expresión de este gen carece de actividad β -galactosidasa. Esta cepa de *E. coli* posee un gen lacZ defectuoso en 5' aunque posee un codón AUG interno que permite el inicio de la traducción del mensajero lacZ, defectivo, en un polipéptido sin actividad β -galactosidasa.

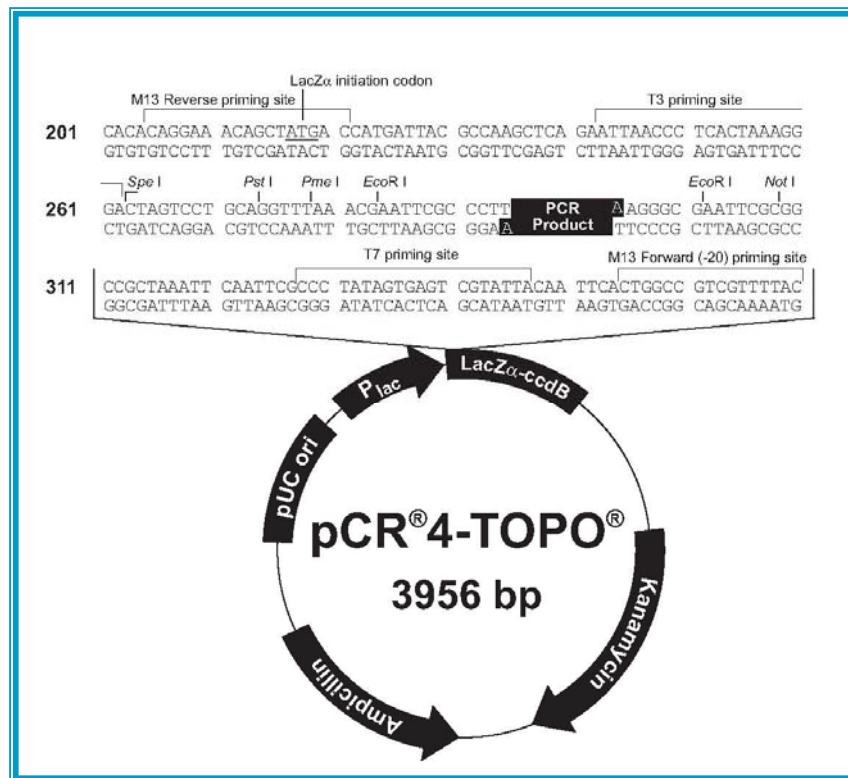


Figura 14. Mapa génico del plásmido pCR[®]4-TOPO[®] en la que destacan dos genes que actúan como marcadores de selección: Amp^R, gen de resistencia a la Ampicilina, y lacZ que codifica para la enzima β -galactosidasa, pero defectuoso en 3'. Dentro del gen lacZ se localizan las diferentes dianas de inserción en lo que se conoce como *polylinker* (región rica en diferentes dianas de restricción únicas). Así, en un experimento de clonación, cualquier inserto de ADN foráneo interrumpiría el gen lacZ del plásmido y la bacteria con plásmido recombinante carecería de función β -galactosidasa. Uno de los productos de degradación del X-gal forma un precipitado de color azul sobre las colonias bacterianas con función β -galactosidasa.

Cuando una célula DH5 α es transformada con el plásmido intacto, los polipéptidos producidos por los dos genes lacZ defectuosos (el de la bacteria y el del plásmido), que carecían de actividad β -galactosidasa por separado, complementan (fenómeno conocido con el término complementación α) y la célula ve restablecida la función β -galactosidasa. Sin embargo, la complementación no ocurre si el plásmido introducido en la bacteria es un plásmido recombinante. Ello es porque las diferentes dianas de inserción se localizan dentro del gen lacZ en lo que se conoce como *polylinker* (región rica en diferentes dianas de restricción únicas). Así, en un experimento de clonación, cualquier inserto de ADN foráneo interrumpiría el gen lacZ del plásmido y la bacteria con el plásmido recombinante carecería de función β -galactosidasa como las bacterias DH5 α sin plásmido.

La presencia de los marcadores Amp^R y lacZ en el plásmido permite seleccionar bacterias con plásmidos recombinantes tras un experimento de clonación. Para ello, las células DH5α que han pasado por una experiencia de transformación son sembradas en una placa con medio de cultivo sólido que contiene Ampicilina y X-gal. Uno de los productos de degradación del X-gal forma un precipitado de color azul sobre las colonias bacterianas con función β-galactosidasa. La forma de discriminar entre las tres poblaciones de células bacterianas obtenidas tras un experimento de clonación en una placa con LB+Amp+X-gal tiene su base en lo siguiente:

1. Las bacterias no transformadas (carecen de plásmido) no crecerán dado que son sensibles al antibiótico.
2. Las bacterias transformadas con el plásmido no recombinante (sin inserto de ADN) crecerán formando colonias de color azul, dado que son resistentes a Ampicilina y tienen actividad β-galactosidasa.
3. Las bacterias transformadas con el plásmido recombinante (con el producto de PCR inserto) crecerán formando colonias de color blanco por ser resistentes al antibiótico y no tener actividad β-galactosidasa).

13. SIMBIOSIS LIQUÉNICA: ¿MUTUALISMO O PARASITISMO ATENUADO?

La simbiosis es un sistema de interacción interespecífica que se lleva a cabo por penetración celular de un individuo de una especie entre las células de un individuo de otra especie que es compatible metabólicamente con el primero. Las diferentes formas de simbiosis tienen en común la definición genética de incompatibilidad, de tal forma que un organismo capaz de formar un estado de simbiosis sea molecularmente capaz de discriminar entre especies compatibles o incompatibles con las que formar asociación (Vicente y Legaz, 2000).

Si el líquen es una asociación mutualista o parasítica está sujeto a controversia. Muchos biólogos consideran a los líquenes como uno de los más elaborados ejemplos de mutualismo debido a su amplia distribución y la salud aparente de los fotobiontes

en el talo (Ahmadjian, 1993). Ahmadjian y Jacobs (1981), no obstante, basándose en sus estudios de resíntesis, pensaron que la relación en un líquen es de un parasitismo controlado, dado que las células del fotobionte son víctimas, antes que compañeras, del micobionte

Estudios morfológicos y ultraestructurales en líquenes sugieren que el hongo regula el crecimiento y el desarrollo de los clorobiontes así como el control del número de células del fotobionte dentro del talo (Molina *et al.*, 1998a). Honnegger (1987) propone un posible mecanismo para regular el crecimiento del fotobionte a través de ácidos fenólicos sintetizados por el micobionte. Estos fenoles cristalizan en las paredes celulares del fotobionte y su asimilación por las células fotosintéticas permite su acción como agentes ficocidas (Ávalos y Vicente, 1987).

Estos mecanismos de ataque por parte del micobionte son parcialmente evitados por el clorobionte mediante el desarrollo de sistemas de defensa tales como la deposición de esporopolenina en sus paredes celulares (Honegger y Brunner, 1981) o la producción de un ligando de pared por parte del alga para impedir la entrada de enzimas hidrolíticas tipo lectinas como las arginasas glicosiladas producidas por el hongo (Molina *et al.* 1993; 1996). Cabe entonces plantearse que el papel de las lectinas no sea la de reconocimiento entre los biontes de un líquen, sino la atenuación de su potencial parasitismo (Vicente y Legaz, 2000).

El hecho de que la lectina sea una glicoproteína constitutiva con actividad arginasa y el receptor algal sea una ureasa inducible por urea y transitoriamente residente en la pared celular, hace que la secreción de arginasa pueda entenderse como un ataque parasitario del hongo mientras que la expresión del receptor en las paredes de las células algales sea un mecanismo de defensa para establecer la relación mutualista entre los dos biontes. De esta manera, la arginasa quedaría retenida en el exterior de la pared celular del alga. Sin embargo, cuando el receptor de pared no ha sido inducido previamente, la lectina penetra libremente en el interior celular produciendo un aumento en la concentración de putrescina endógena del clorobionte superando el umbral que el alga necesita para su crecimiento.

A continuación los cloroplastos degradan su pirenoide y desorganizan las lamelas plastidiales (Molina y Vicente, 1995). Además, la putrescina actúa como

activadora de sistemas β (1 \rightarrow 4) glucanasa, que hidrolizan zonas determinadas de la pared celular del alga, produciendo incluso su ruptura y la liberación del protoplasto al medio externo (Molina *et al.*, 1998b). Durante este proceso, el alga trata de reconstruir las zonas dañadas aumentando la producción de polisacáridos y sacándolos al espacio periplásmico mediante un proceso de pinocitosis inversa, pero en la mayor parte de los casos, este intento es inútil y la célula muere (Molina *et al.*, 1998a).

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo han sido:

1. Establecer la especificidad de la unión lectina-ligando sobre la base de la estereo-isomería del azúcar reconocido por el dominio activo de la lectina.
2. Acción de la lectina sobre la degradación del cloroplasto de clorobiontes incompatibles mediante el estudio de la estabilidad de los complejos clorofila-proteína.
3. Extensión del modelo de reconocimiento-discriminación por interacciones lectina-ligando a cianolíquenes.
4. Iniciar la caracterización proteómica de la lectina de *Evernia prunastri*.
5. Construcción de un oligonucleótido con suficiente grado de homología con la arginasa de *E. prunastri* para ser posteriormente utilizado en la búsqueda de una lectina activa en especies de diferentes familias de líquenes.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los organismos utilizados en este trabajo han sido líquenes, tanto de algas verdes o clorobiontes (clorolíquenes), como de cianobacterias o cianobiontes (cianolíquenes), formando parte del talo como fotobiontes. Las tres especies de líquenes fueron recogidas en el encinar de “La Quinta” (El Pardo, Madrid, España).

1.1. Clorolíquenes

- *Evernia prunastri* (L.) Ach., un cloroliquen del orden Lecanorales y familia *Parmeliaceae*, recogido sobre la corteza de *Quercus ilex* L. ssp. *ballota* (Desf.) Samp. La recogida de los ejemplares se efectuó en distintas épocas del año que se especificarán en cada caso. Las muestras, limpias y secas, se almacenaron en oscuridad, en bolsas de plástico hasta su posterior uso, durante un período nunca superior a un mes (**Fig. 15**).



Figura 15. Ejemplar de *Evernia prunastri*.

-*Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr., un líquen crustáceo del orden Lecanorales y la familia *Teloschistaceae*, conteniendo *Pseudotreboxia aggregata* como clorobionte, fue recogido de la corteza de *Quercus ilex* L. ssp. *ballota* (Desf.) Samp. Los ejemplares se dejaron secar al aire y se almacenaron en oscuridad hasta su uso (**Fig. 16**).



Figura 16. Ejemplar de *Xanthoria parietina*.

1.2. Cianolíquenes

-*Leptogium corniculatum* (Hoffm.) Minks., un cianolíquen perteneciente al orden Lecanorales y a la familia *Collemaaceae*, cuyo cianobionte es una especie del género *Nostoc*, recolectado en Octubre de 2006. Este líquen vive en asociación con diversas especies de briófitos, entre las que se encuentran *Homalothecium lutescens* (Hedw.) Rob., *Syntrichia ruralis* (Hedw.) Weber y Mohr, y *Bryum alpinum* With. Los talos de *Leptogium* se separaron de los musgos, se dejaron secar al aire y se almacenaron a temperatura ambiente nunca más de dos semanas (**Fig. 17**).



Figura 17. Ejemplar de *Leptogium corniculatum*.

2. AISLAMIENTO DE FOTOBIONTES

2.1. Aislamiento de clorobiontes de *E. prunastri*

Evernia prunastri contiene al alga verde *Trebouxia excentrica* como clorobionte y el método de aislamiento se describe a continuación, basado en el trabajo de Fontaniella *et al.* (2000) con ligeras modificaciones (**Fig. 18**).

Muestras de 0,5 g (con variaciones según los casos) de talos de *E. prunastri*, previamente lavados con agua destilada para eliminar contaminaciones, se maceraron en morteros de cerámica con 10 mL de agua destilada. El homogeneizado se filtró a través de tres capas de gasa y fue seguidamente centrifugado a $1.400 \times g$ durante 4 min. El sobrenadante fue desechado y el precipitado se resuspendió en 8 mL de una solución de sacarosa 0,25 M. Esta suspensión fue repartida lentamente, con objeto de no romper las fases, en sendos tubos de ensayo conteniendo 5 mL de KI al 80% (p/v). Se añadieron 2 mL de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,2, a cada tubo para después ser centrifugados a $14 \times g$ durante 20 s.

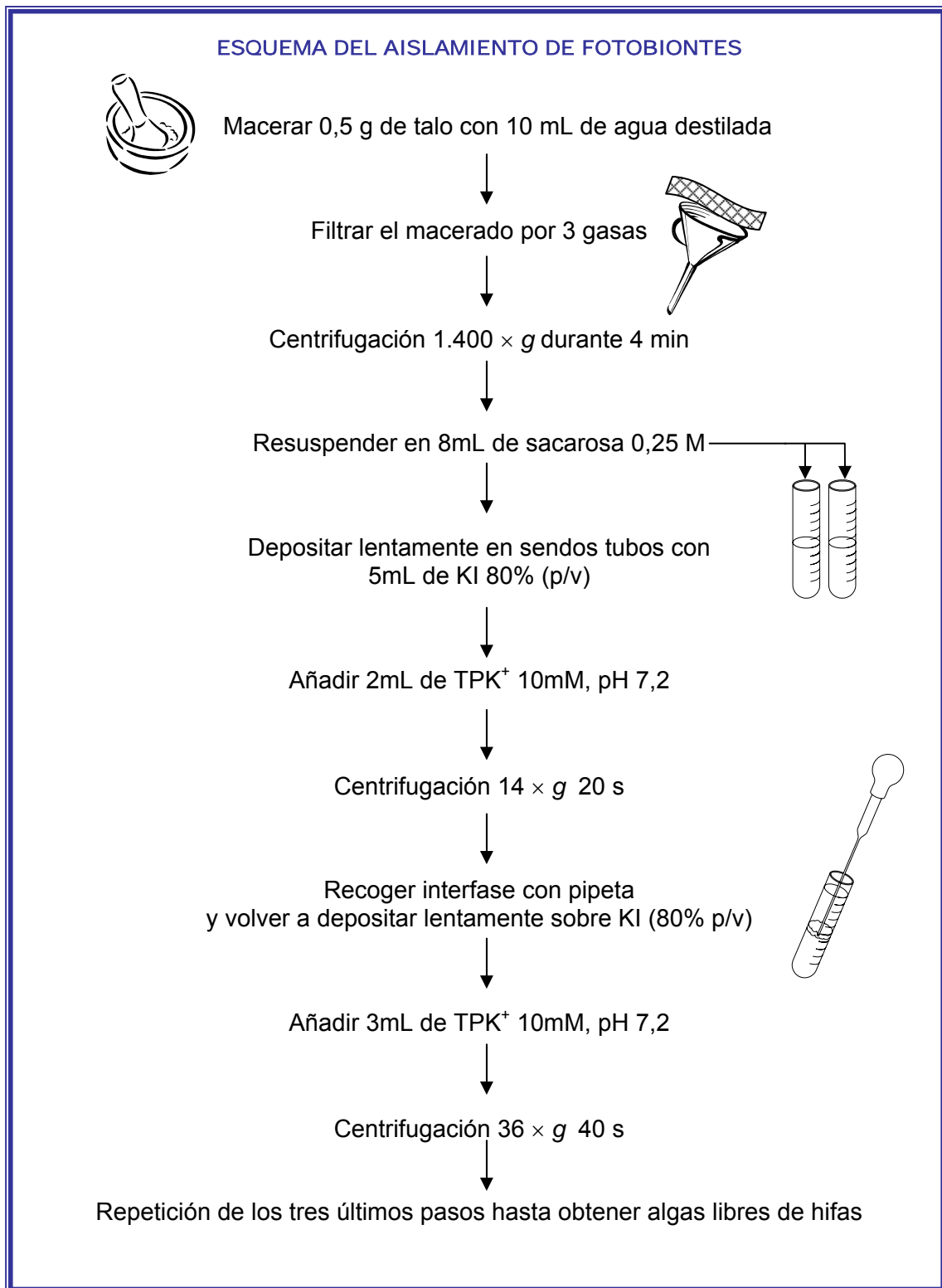


Figura 18. Esquema del aislamiento de fotobiontes a partir de talos liquénicos.

Llegados a este punto, los fragmentos de talo que no se hubieran disgregado suficientemente en la maceración se encontrarían en el fondo del tubo, mientras que los fragmentos de menor tamaño conteniendo hifas y algas estarían en suspensión en la fase acuosa asentada sobre el KI 80% (p/v) formando una densa interfase. Esta capa se recuperó con una micropipeta y se volvió a depositar sobre un tubo con 5 mL de KI 80% (p/v), dejando caer la suspensión por las paredes. De igual modo, se añadieron 3 mL de tampón fosfato potásico 10mM pH 7,2 y se centrifugó a $36 \times g$ durante 40 s.

Las células del alga van formando una capa verde bien diferenciada sobre la disolución de KI (**Fig. 19**); mientras que los pequeños fragmentos de hifas quedan suspendidos en la solución de sacarosa y los más grandes se depositan en el fondo del tubo de centrifuga. La interfase algal se recuperó nuevamente con una micropipeta y se depositó sobre un tubo con 5 mL de KI 80 % (p/v). Este último paso se repitió tantas veces como fue necesario hasta lograr una suspensión de algas libre de hifas visible al microscopio óptico (**Fig. 20**).

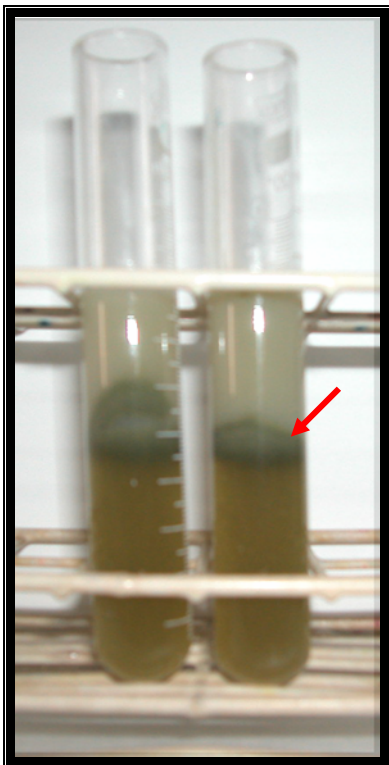


Figura 19. Detalle de la interfase formada por algas entre el KI, parte inferior, y la sacarosa y el tampón fosfato, parte superior.

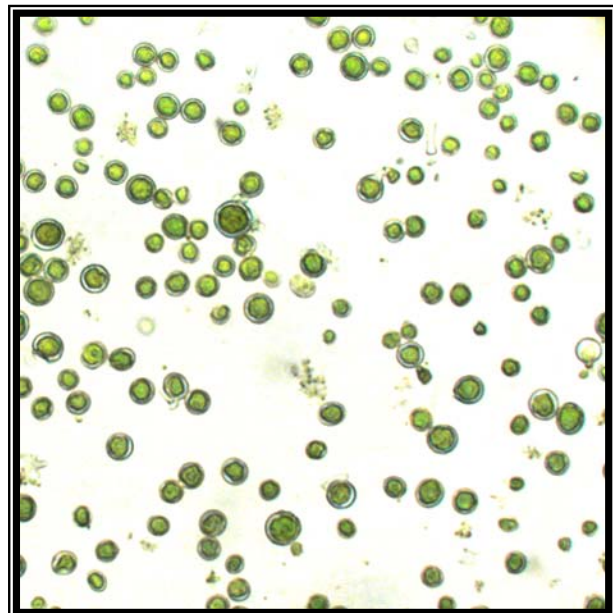


Figura 20. Clorobiontes aislados a partir de *Evernia prunastri*, libres de hifas en tampón fosfato potásico.

2.2. Aislamiento de cianobiontes de *L. corniculatum*

El aislamiento de las cianobacterias de *Leptogium* se realizó como se indica en el apartado anterior para el caso de *E. prunastri*, pero con un paso final añadido. La suspensión resultante no estaba libre de hifas; por tanto, se añadió una solución de nistatina 10 μM , en lugar de kabicina, como recomiendan Miura y Yokota (2006), durante 48 h a 26° C en oscuridad.

3. LOCALIZACIÓN CITOQUÍMICA DE LA ACTIVIDAD UREASA EN PAREDES DEL FOTOBIONTE

3.1. Reacción citoquímica ureasa

La enzima ureasa (EC 3.5.1.5), en medio acuoso, rompe la urea en NH_3 y CO_2 , éste último se convierte en CoCO_3 al reaccionar con CoCl_2 . El CoCO_3 forma precipitados negros e insolubles en presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ visibles al microscopio óptico indicando la presencia de la ureasa en el clorobionte (Millanes *et al.*, 2004; Gomori, 1952) (**Fig. 21**).

Se incubaron 0,5 mL de la suspensión de algas con 0,5 mL de Fast-Green 8 % (p/v) (Sigma Chem. Co., St Louis, MO) en agua destilada durante 30 min para bloquear fenoles que pudieran quelar el catión cobalto Co^{2+} (Lison, 1960). Se centrifugaron durante 5 min a $10.000 \times g$ y se lavaron con agua destilada.

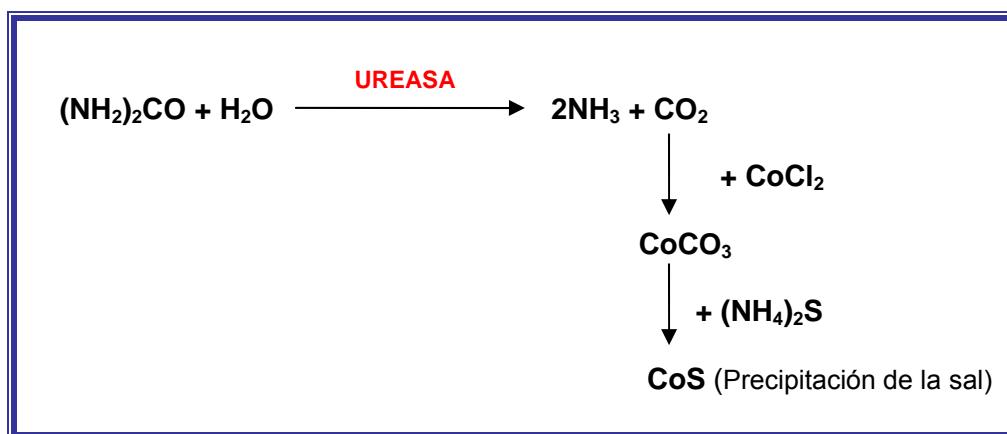


Figura 21. Esquema de la reacción citoquímica de la ureasa en presencia de cloruro de cobalto.

Después se resuspendieron en 1 mL de CoCl_2 10 mM y urea 40 mM a 37° C 30 min en agitación constante y, en las mismas condiciones, otro lote de algas sin adición de urea a la suspensión, como tratamiento control. Tras centrifugar y lavar, se añadió una gota de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ en cada muestra y, nuevamente, se volvió a centrifugar y lavar para ser observadas bajo el microscopio óptico.

3.2. Detección de la actividad ureasa y observación por Microscopía Óptica

Cuatro muestras diferentes fueron preparadas para observar la presencia de ureasa en pared celular. Dos lotes de algas recién aisladas, según el apartado 1 de Material y Métodos, pertenecían a talos de *E. prunastri* recolectados en primavera (Mayo, 2004) y otros dos provenían de talos recolectados en el mismo lugar pero en otoño (Noviembre, 2004). De cada pareja de lotes, uno se utilizó como grupo control, sin previa incubación con urea, y el otro fue incubado con urea 40 mM para inducir el receptor.

Las preparaciones microscópicas de cada una de las muestras fueron observadas en objetivo de inmersión al Microscopio Óptico Olympus BX51 en el modo campo claro utilizando condensadores y objetivos de contraste de fase. Las micrográficas fueron tomadas con una cámara CCD, modelo Coolpix 5000 Nikon, acoplada al microscopio mediante un adaptador óptico usando el programa Viewfinder Lite.

4. ACTIVIDAD UREASA

4.1. Inducción de ureasa

Muestras de 15 g de talo de *E. prunastri* fueron embebidos en 150 mL de tampón fosfato potásico 75 mM a pH 6,9 durante 6 h en oscuridad (Pérez-Urria y Vicente, 1989) con urea a una concentración de 40 mM. El medio fue filtrado a través de filtros Millipore GS (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) de 0,22 μm de diámetro de poro y seguidamente dializado frente al mismo tampón durante 24 h a 2° C para eliminar metabolitos de bajo peso molecular.

El dializado fue entonces resuspendido en un volumen final de 400 mL. Fue llevado a saturación con sulfato de amonio al 60 % y centrifugado a $43.000 \times g$ durante 1 h a 2° C. El sobrenadante se dializó nuevamente frente a 5 L de tampón fosfato 1 mM, pH 6,9 durante 24 h y 2° C de temperatura. La proteína obtenida fue absorbida sobre un gel de fosfato de calcio (75 mg de peso seco de gel por mg de proteína). El precipitado de una centrifugación de dicho gel a $9.000 \times g$ durante 10 min fue utilizado para eluir la proteína con tampón fosfato a concentraciones crecientes desde 1 a 100 mM, en incrementos de 5 mM. La muestra eluida de la fracción de tampón fosfato 1 mM se filtró a través de una columna de Sephadex G-200 (21 cm \times 3 cm) y equilibrada con el mismo tampón (Legaz *et al.*, 2004).

4.2. Valoración de la actividad ureasa

La actividad ureasa fue determinada mediante el método de microdifusión de Conway (1962) midiendo la producción de amonio en la mezcla de reacción. Dicha mezcla contenía 40 μ L de urea 40 mM, 150 μ mol de tampón fosfato potásico a pH 6,9 y 20 μ g de proteína en un volumen final de 5 mL. La reacción se llevó a cabo a 37° C durante 30 min y se detuvo por adición de 0,5 mL de carbonato de potasio saturado. Una unidad de actividad específica ureasa se definió como 1,0 μ mol de amonio producido por mg de proteína y minuto.

4.3. Valoración de proteínas

Para valorar el contenido de proteínas se utilizó el método de Lowry y colaboradores (1951) con ligeras modificaciones para eliminar el exceso de fenoles en las muestras, (Potty, 1969).

Se tomaron 0,5 mL de cada muestra, se mezclaron con 0,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 7 % (p/v) y se dejó reposar 30 min a 4° C. La mezcla se centrifugó a $5.600 \times g$ durante 15 min, de modo que en el sobrenadante quedaran los fenoles y en el precipitado las proteínas. Este último se resuspendió nuevamente en el volumen inicial con agua ultrapura Milli-Q™ y se procedió a la valoración de proteínas con el reactivo de Folin midiendo finalmente densidad óptica a 500 nm. Como patrón se empleó seroalbúmina bovina (0,1 mg mL⁻¹) tratada igualmente con TCA al 7 %.

5. ACTIVIDAD ARGINASA

5.1. Inducción de la arginasa segregable en *E. prunastri*

La arginasa segregable de *E. prunastri* fue purificada de acuerdo con Legaz y colaboradores (2001). Muestras de 1g de talo de *E. prunastri* se incubaron en placas con 20 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15, conteniendo 40 mM de L-arginina durante 8 h a 26° C en oscuridad (Planelles y Legaz, 1987). El medio se filtró a través de papel Whatman 3MM (W. & R. Blaston Ltd., Maidstone, UK), y a través de filtros Millipore GS (0,22 µm de diámetro de poro, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) con ayuda de una bomba de vacío. Después se dializó frente a tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15, durante 20 h a 4° C en oscuridad. El extracto resultante fue purificado y reservado a -20 °C para su posterior utilización en los diferentes ensayos.

5.2. Inducción de la arginasa segregable en *L. corniculatum*

En el caso del cianoliquen, se sumergieron fragmentos de 0,5 g de liquen en 10 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15, con y sin L-arginina 40 mM. Se mantuvieron en oscuridad a 25° C durante diferentes tiempos de incubación: 4 minutos, 2, 4, 6 y 8 horas.

El medio de incubación se sometió a una cromatografía de reparto en fase orgánica (1:1 v/v) para separar los distintos fenoles que pudieran interaccionar en las medidas de actividad arginasa posteriores, usando en primer lugar éter dietílico : acetato de etilo (65 : 35 v/v), durante 15 min en agitación a 40° C, y posteriormente la fase tamponada se mezcló con cloroformo : acetonitrilo (60 : 40 v/v) durante 15 min en agitación a 40° C, quedando libre de compuestos orgánicos, entre ellos los fenoles.

5.3. Aislamiento de la arginasa segregable de *L. corniculatum* por cromatografía de afinidad

Los ligandos de pared celular fueron aislados por cromatografía de afinidad usando agarosa activada con bromuro de cianógeno conteniendo ureasa segregada por talos de *E. prunastri*, tal y como se indica en el apartado 4.1. (**Fig. 22**).

Los lechos de agarosa fueron preparados hidratando por completo la agarosa con agua ultrapura Milli-Q™ y mezclándola después con una solución 20 mL de ureasa purificada en una concentración de 0,5 mg mL⁻¹ de proteína en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 durante 16 h a 4 °C. A la mezcla se añadieron 0,6 g de glicina y se dejó 8 h a temperatura ambiente (Walters, 1985).

Durante este tiempo, la glicoproteína se une a la agarosa activada mediante la formación de una función isourea con un grupo amino de la proteína. La agarosa activada unida a ureasa fue empaquetada en columnas de 4 cm de largo por 1 cm de diámetro interno y se lavaron con 300 mL de tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 manteniendo un flujo constante de 1 mL min⁻¹ para eliminar las glicoproteínas no adheridas a la agarosa. A continuación, se añadieron los medios procedentes de la incubación de 0,5 g de *L. corniculatum* durante 2 h en 10 mL de tampón Tris-HCl 10mM, pH 9,15 con L-arginina 40 mM en un volumen de 2 mL. Estos medios se mantuvieron en contacto con la matriz durante 2 h a temperatura ambiente.

Una de las columnas se eluyó con tampón Tris-HCl 10mM, pH 9,15, y la otra con el mismo tampón conteniendo α -D-galactosa 50mM, obteniéndose 16 fracciones de 3 mL cada una de ellas. En cada fracción se valoró la actividad arginasa y la cantidad de proteínas. La columna eluida sólo con tampón se sometió a una segunda elución con tampón Tris-HCl 10mM, pH 9,15 conteniendo galactosa 50mM y a una tercera con tampón Tris-HCl 10mM, pH 9,15 y manosa 50mM, de forma secuencial. Las fracciones con mayor actividad arginasa se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS como agente desnaturalizante.

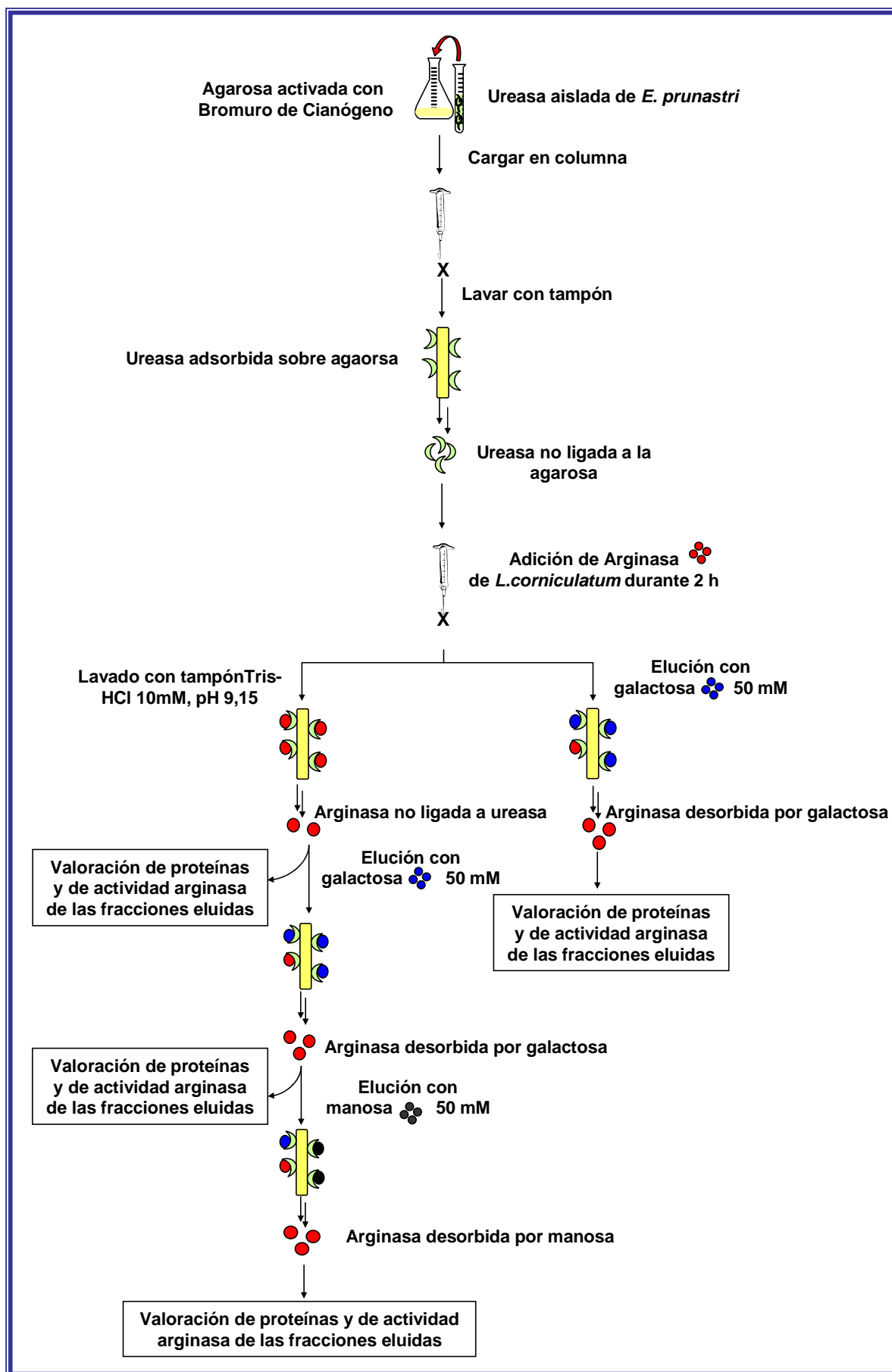


Figura 22. Esquema del aislamiento de la arginasa por cromatografía de afinidad mediante ureasa adsorbida sobre agarosa activada con bromuro de cianógeno.

5.4. Obtención de la arginasa talina de *L. corniculatum*

Después de la incubación de *L. corniculatum* en arginina o en tampón solamente, los talos se secaron suavemente con papel de filtro y se maceraron con 7,7 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15, conteniendo sulfato de manganeso 0,5 mM y ácido maleico 0,75 mM. Los homogeneizados se centrifugaron durante 20 min a $3.920 \times g$ y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman 3 MM (W. & R. Blaston Ltd., Maidstone, UK). Se obtuvo un extracto libre de células en el que se valoró la actividad arginasa del talo y la cantidad de proteínas. Todo el proceso se realizó en frío.

5.5. Valoración de la actividad arginasa

La actividad arginasa o L-arginina amidinohidrolasa (E.C. 3.5.1.3.), fue medida de acuerdo con el método de Greenberg (1955), modificado por Legaz y Vicente (1980), incluyendo ureasa cristalizada (Sigma Chem. Co.) en la mezcla de reacción. La hidrólisis de la L-arginina por la enzima arginasa rinde L-ornitina y urea (Legaz, 1991). Asimismo, la urea es hidrolizada por ureasa para dar CO_2 y NH_4^+ (Fig. 23).

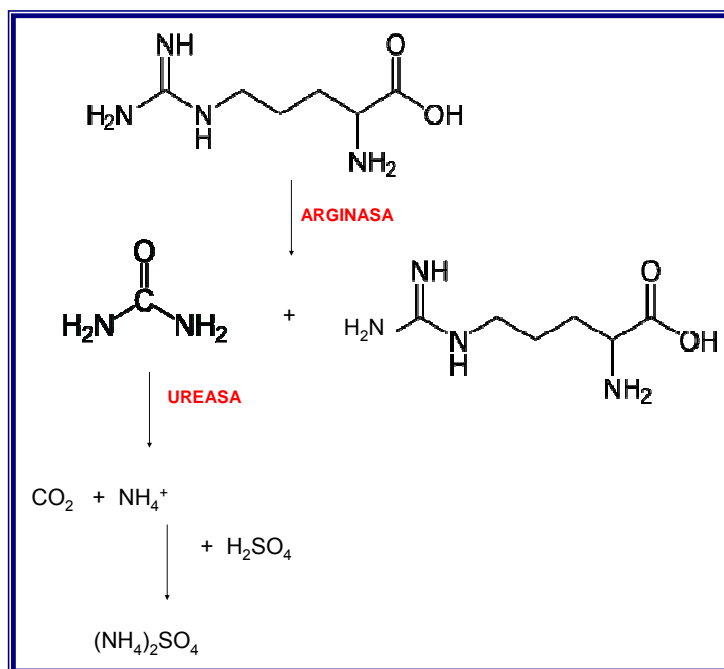


Figura 23. Esquema de la reacción de la arginasa incluyendo ureasa en la mezcla de reacción valorada en el Método de Conway.

Estas reacciones se llevaron a cabo en unos recipientes de vidrio cuya estructura permite la microdifusión del NH_4^+ a otro compartimento donde su aparición se mide mediante fijación a 1 mL de H_2SO_4 , 0,02N (Conway, 1962) (**Fig. 24**).

Cada muestra, susceptible de contener actividad arginasa, se añadió sobre 10 μmol de tampón Tris-HCl a pH 9,15, 0,4 μmol de L-arginina, 7,5 μmol de ácido maleico, 5 μmol Mn^{2+} (como cofactor de la enzima arginasa, añadido como sulfato de manganeso) y 8,1 mg de ureasa cristalina tipo III. La reacción se desarrolló en una estufa a 37° C con un volumen final de 3 mL localizado en el pocillo externo hasta que se detuvo mediante adición de 0,5 mL de K_2CO_3 al 95 % (p/v). La difusión del NH_4^+ al pocillo interno requirió 2 h para su conversión total en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los controles para la valoración arginasa se prepararon sustituyendo el sustrato (L-arginina) por un volumen igual del tampón utilizado.

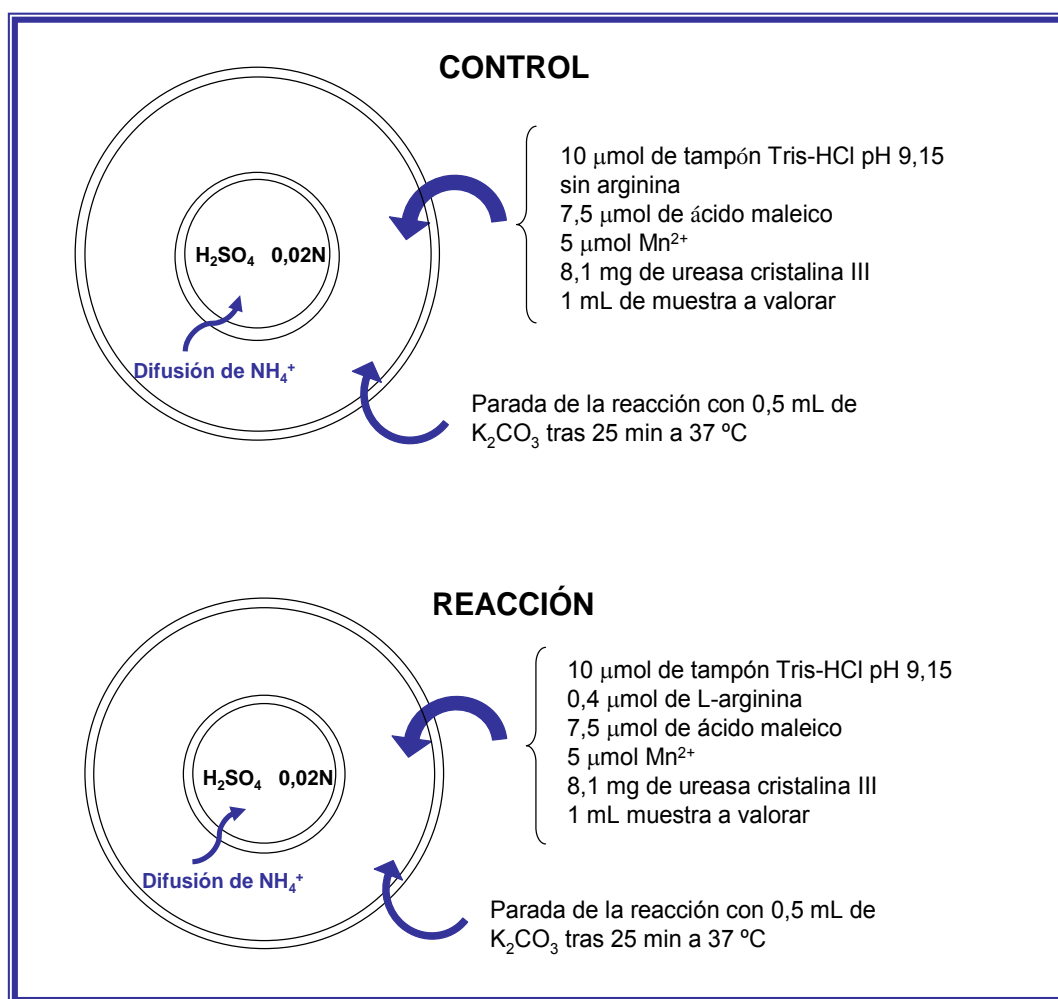


Figura 24. Esquema del protocolo para la valoración de la actividad arginasa indicando el lugar de adición de cada reactivo en los recipientes de vidrio.

La valoración de NH_4^+ se realizó mediante la reacción de Nessler (Standard Methods, 1955) midiendo absorbancia a 440 nm en un espectrofotómetro Zeiss PM2 DL. Para ello, se tomaron 0,5 mL del producto de reacción del pocillo interno, se disolvieron en 4,5 mL de agua destilada y se añadieron 0,3 mL de reactivo de Nessler. Los datos de absorbancia se interpolaron en una recta patrón construida con concentraciones crecientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la que se obtienen los μmoles de NH_4^+ formados. La velocidad de reacción se determinó como los μmoles de NH_4^+ formados por unidad de tiempo. La unidad de actividad específica enzimática fue definida como 1 μmol de NH_4^+ formado por mg de proteína y por minuto. La valoración de proteínas se realizó según el apartado 4.3.

6. EFECTOS DEL FRIO Y EL FOTOPERIODO SOBRE TALOS DE *E. prunastri*

6.1. Simulación de condiciones invernales

Los talos de *E. prunastri*, recién recolectados, fueron rehidratados con agua destilada y se mantuvieron bajo unas condiciones de fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de oscuridad a temperatura ambiente. Los controles se expusieron a un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Alternativamente, talos previamente rehidratados fueron almacenados durante un día a -6°C y durante dos días a 5°C antes de ser seccionados para su observación microscópica. Los controles se dejaron a temperatura ambiente durante tres días.

6.2. Cortes histológicos

Se realizaron cortes del talo de aproximadamente 8 μm de espesor con un microtomo de congelación y se observaron en fresco sin ningún tipo de tinción en un invertomicroscopio Zeiss. La toma de imágenes se realizó mediante acoplamiento de una cámara Nikon 5000 Coolpix a dicho microscopio y se analizaron con el programa Image Tool 2.0 (University of Texas Health Service Center, San Antonio, Texas, USA).

6.3. Preparación de las muestras para TEM

Los distintos especímenes de *E. prunastri*, expuestos a distintas condiciones de temperatura y fotoperiodo, fueron analizados ultraestructuralmente según el protocolo para TEM (de los Ríos y Ascaso, 2002) modificado para líquenes. Todos los pasos se realizaron bajo campana de flujo laminar.

Los talos rehidratados de *E. prunastri* se cortaron en fragmentos de 1-2 mm² para mejorar la penetración de los fijadores en el tejido y acortar el tiempo de fijación. El primer fijador (aldehído) preserva las estructuras proteicas y el segundo (tetróxido de osmio) complementa al primero puesto que fija los lípidos.

6.3.1. Fijación

Los fragmentos se colocaron en pequeños tubos (5 cm de alto por 1 cm de diámetro interno) donde permanecieron para el resto de los pasos, durante 5 h a 4° C con el primer fijador: glutaraldehído 2,5 % en tampón fosfato pH 7,4 Milloning (Milloning, 1961). Se sometieron a vacío dos veces durante 10 min, lo que favoreció la penetración del primer fijador en la estructura líquénica en lugar de flotar sobre él debido a los espacios aéreos asociados a dicha estructura (de los Ríos y Ascaso, 2002).

Las muestras fueron lavadas seis veces, 10 min cada vez, a temperatura ambiente con tampón Milloning. Después se dejaron en oscuridad durante 2 h en el fijador secundario compuesto de tetróxido de osmio al 1 % en tampón Milloning. Se volvieron a lavar y se procedió a la fase de deshidratación.

6.3.2. Deshidratación

Las muestras fueron embebidas en series de soluciones de acetona de concentración creciente tal y como se indica a continuación:

30 % de acetona, tres cambios de solución nueva en 45 min.

50 % de acetona, tres cambios de solución nueva en 45 min.

70 % de acetona, tres cambios de solución nueva en 45 min.

80 % de acetona, tres cambios de solución nueva en 45 min.

90 % de acetona, tres cambios de solución nueva en 45 min.

95 % de acetona, tres cambios de solución nueva en 45 min.

100 % de acetona, seis cambios de solución nueva durante 1 h.

6.3.3. Obtención de cortes y tinción

Después de la deshidratación se añadió una solución de acetona : resina Spurr (3 : 1 v/v) (Spurr, 1969) y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. La solución se cambió por otra de proporción 1 : 1 (v/v) durante 6 h y por último se dejó toda la noche en acetona : resina Spurr (1 : 3 v/v). Los fragmentos se depositaron en la resina sola durante 24 h, con un cambio de resina nueva. Finalmente se colocaron en unos moldes de plástico con resina nueva en una estufa a 70° C durante 48 h. Los bloques de resina se prepararon para ser seccionados en un ultramicrotomo recortando un poco los bordes y dándoles forma de pirámide. Después se fueron cortando secciones semi-finas hasta tener la cara del bloque totalmente lisa.

Se realizaron cortes semi-finos (0,35-0,5 μm) con una cuchilla de vidrio acoplada a un ultramicrotomo depositando dichos cortes en una pequeña balsa de agua. Se tiñeron con azul de metileno para indicar la orientación de los cortes. Los cortes ultra-finos (70-90 nm) se hicieron con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo OmU2 Reichert y se depositaron en rejillas de cobre recubiertas de piroloformo. Se tiñeron con citrato de plomo (Reynolds, 1963) en una placa Petri para impedir la exposición al aire en la medida de lo posible. Los cortes se cambiaron rápidamente a otra placa con una lámina de Parafilm M® y unas gotas de solución nueva de citrato de plomo.

Las rejillas se retiraron del tinte después de 10 min de contacto y se lavaron tres veces con agua. Las preparaciones se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips E.M. 300.

7. ENSAYOS DE LIGAMIENTO DE LA LECTINA FÚNGICA SOBRE LOS CLOROBIONTES

7.1. Modificaciones de la pared celular

El protocolo completo se muestra en un esquema en la **figura 25**. Se aislaron tres lotes de fotobiontes a partir de talos *E. prunastri* recolectados en primavera (Mayo, 2004) siguiendo el protocolo descrito anteriormente y después fueron incubados en urea 40 mM durante 8 h para inducir el receptor de pared (Legaz *et al.*, 2004). La urea fue retirada por centrifugación y los fotobiontes se resuspendieron en 1 mL tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,2. Asimismo, otros tres lotes de algas aisladas de talos recolectados en otoño (Noviembre, 2004), portadoras del receptor de pared, fueron igualmente objeto de los siguientes tratamientos.

Cada una de las tres suspensiones de algas fueron incubadas con 1 mL de α -galactosidasa (E.C. 3.2.1.22) (5 unidades mL⁻¹) disuelta en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 6; 1 mL de β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) (5 unidades mL⁻¹) en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,3; y 1 mL tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,2 (grupo control), respectivamente, durante 2 h a 30° C. Después de la incubación, se centrifugaron todas las muestras durante 5 min a 10.000 $\times g$. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de azúcares hidrolizados y de galactosa en particular. El precipitado de algas se dedicó a los diferentes ensayos indicados en su momento.

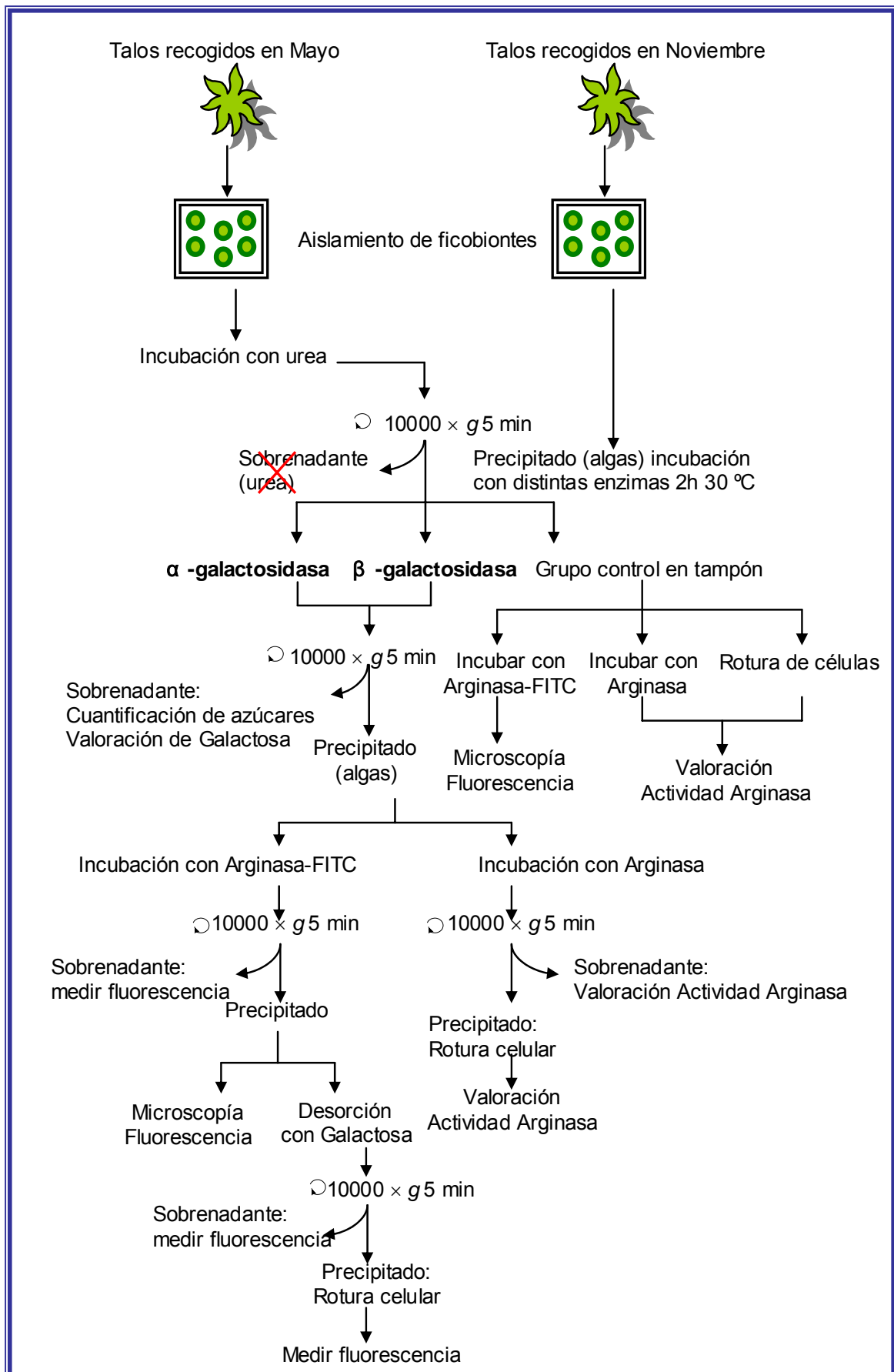
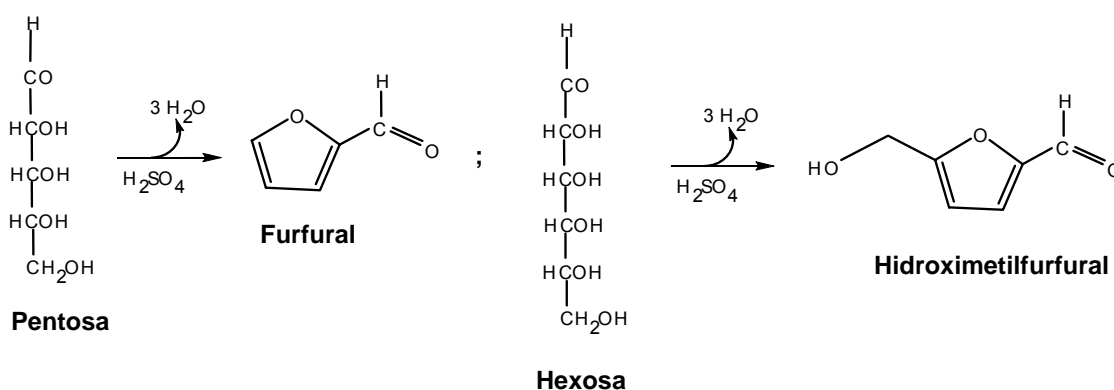


Figura 25. Representación esquemática de todo el protocolo de los ensayos de ligamiento de la lectina de *E. prunastris* sobre sus clorobiontes.

7.1.1. Valoración de azúcares

La cuantificación de los azúcares resultantes de la hidrólisis de las paredes por las enzimas α ó β -galactosidasa, en cada caso, sobre el resto polisacárido del receptor de pared fue realizada según el método de Dubois y colaboradores, (1956) en el que los azúcares son deshidratados con ácido sulfúrico en presencia de fenol. La deshidratación ácida produce furfural (pentosa) o hidroximetilfurfural (hexosa) que dan reacción de color con alcoholes, fenol en este caso:



La mezcla de reacción contenía 0,5 mL del sobrenadante y 0,5 mL de fenol en disolución acuosa al 5 %. En último lugar se adicionaron 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado. Se preparó un blanco sustituyendo la muestra por 0,5 mL de agua destilada. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la densidad óptica a 490 nm en un espectrofotómetro Zeiss PM2 DL. Los valores de absorbancia se interpolaron en una recta patrón construida con concentraciones crecientes de dextrano (Sigma Chem. Co.).

7.1.2. Determinación de la concentración de galactosa

El contenido de galactosa en las muestras fue determinado por la reacción catalizada por una galactosa oxidasa (E.C.1.1.3.9) (Aisaka *et al.*, 1984), la cual oxida el alcohol en C6 de la hexosa con O_2 para dar β -D-galacto-hexo-dilaldosa y peróxido de hidrógeno (Whittaker, 2005). La cantidad de H_2O_2 fue determinada mediante el acoplamiento de una enzima peroxidasa de rábano (EC 1.11.1.7) con guayacol como

sustrato, dando lugar a tetraguayacol, el cual desarrolla un color pardo con absorbancia detectable a 470 nm (Caffaro *et al.*, 1996) (**Fig. 26**).

Las mezclas de reacción contenían 0,5 μL de muestra, 0,95 mL de tampón fosfato pH 6, 0,5 mL de peroxidasa (Sigma Chem. Co.) (1mg mL^{-1}) y 0,1 mL de guayacol. La absorbancia de la mezcla a 470 nm se ajustó a 0. Después se añadió 1 mL de galactosa oxidasa (Sigma Chem. Co.) y se midió el incremento de absorbancia en un espectrofotómetro Zeiss PM 2 DL. Los valores de D.O. se interpolaron en una recta patrón construida con concentraciones crecientes de galactosa.

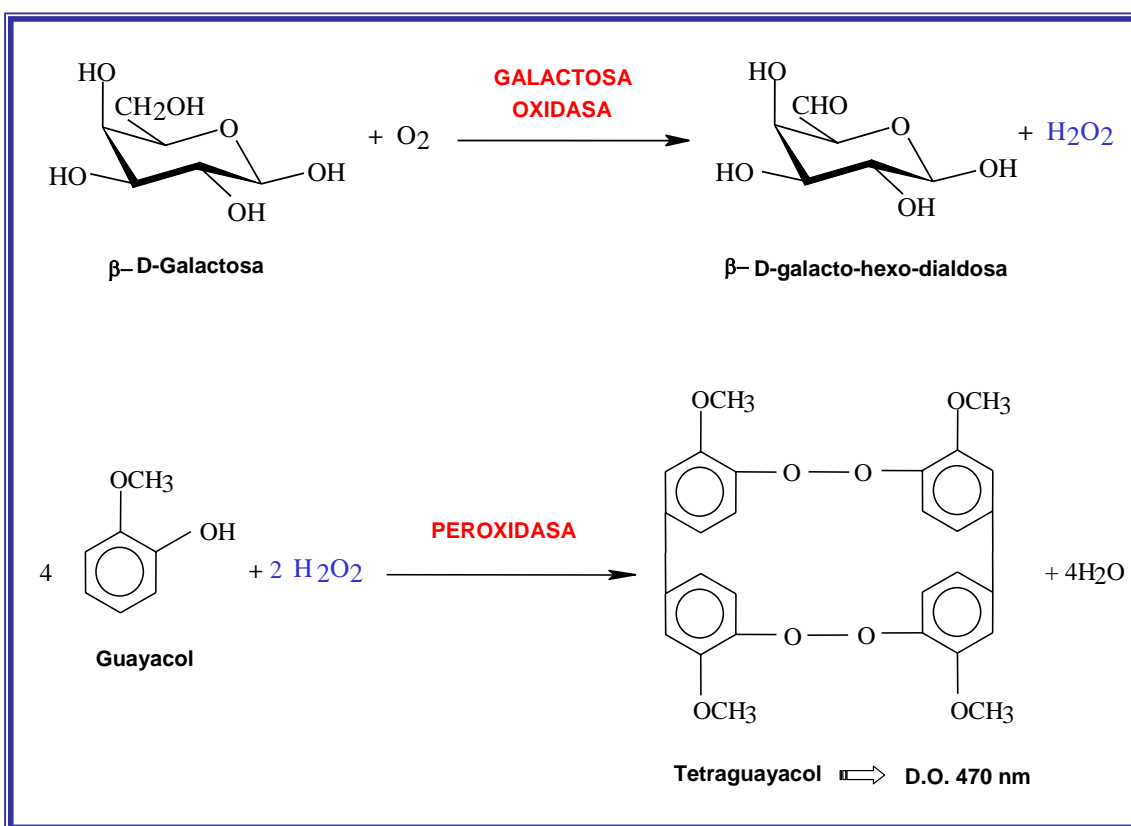


Figura 26. Esquema de la reacción de oxidación la galactosa mediante la enzima galactosa oxidasa y acoplamiento de una peroxidación con guayacol para medir aparición de producto por colorimetría a 470 nm (D.O. del tetraguayacol).

7.2. Unión de la lectina segregable a clorobiontes

El precipitado de algas resultante de la incubación con las diferentes galactosidasas fue puesto en contacto con la lectina segregable inducida a partir de talos de *E. prunastri* durante 2 h a 30°C en agitación constante. Después se centrifugó durante 5 min a $10.000 \times g$ y se valoró actividad arginasa en el sobrenadante.

7.2.1. Valoración de actividad arginasa en el interior celular

Las algas previamente incubadas con las diferentes galactosidasas y posteriormente con la arginasa segregada del talo fueron sometidas a la ruptura de sus paredes celulares para cuantificar la arginasa presente en el interior celular.

La ruptura de las paredes celulares fue realizada sometiendo a cada suspensión de algas a la fuerza mecánica de un percutor eléctrico durante 30 s junto con la adición de alúmina. Los homogeneizados fueron seguidamente centrifugados a $12.000 \times g$ durante 15 min a 2° C. El sobrenadante se reservó y el precipitado, conteniendo paredes celulares y la alúmina sedimentada, se congeló con N₂ líquido y fue sonificado durante 2 min a 20 Hz. Centrifugando nuevamente, se obtuvo un sobrenadante que fue añadido al anterior para valorar la actividad arginasa y la cantidad de proteína. Todas las muestras que estuvieron en contacto con la alúmina fueron dializadas durante 12 h frente al correspondiente tampón previamente al ensayo de actividad enzimática.

7.3. Unión de la lectina marcada con ITCF a clorobiontes

Las algas de *E. prunastri* aisladas a partir de 0,5 g de talo liquénico y expuestas a la hidrólisis de α ó β -galactosidasa (Sigma Chem. Co.) en una concentración de 5 unidades de enzima por mL del tampón correspondiente, fueron incubadas durante 2 h a 30° C con la suspensión de la lectina marcada con ITCF. Igualmente se realizó un control de ligamiento con algas recién aisladas no sometidas a ningún tratamiento. Después se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 5 min para, por un lado, medir la cantidad de fluorescencia del sobrenadante (proteína marcada no unida a las algas) y, por otro, la lectina unida a las paredes celulares y la que hubiera penetrado a través de las mismas en las algas del precipitado.

7.3.1. Marcaje de la lectina con ITCF

La proteína inducida con L-arginina a partir de talos de *E. prunastri* (apartado 5.1.), segregada y parcialmente purificada fue marcada con Isotiocianato de Fluoresceína (ITCF) (**Fig. 27**) (Sigma Chem. Co.) (Molina *et al.*, 1993), un compuesto insoluble en agua con una masa molecular de 332,3 Da capaz de unirse a proteínas para conferirles la capacidad de ser detectadas al emitir fluorescencia amarillo-verdosa. Para ello fue precipitada con acetona al 80 % y se dejó reposar 15 min en frío. Se

centrifugó 15 min a $5.600 \times g$ y el precipitado se dejó secar para eliminar la acetona y fue disuelto en agua hasta alcanzar el volumen de partida.

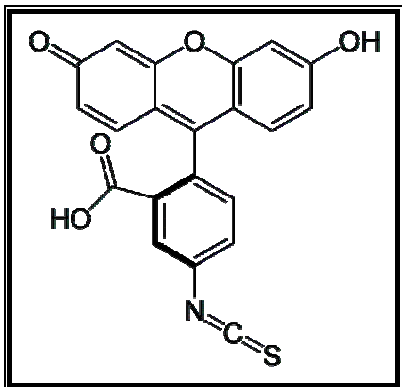


Figura 27. Molécula de Isotiocianato de Fluoresceína (ITCF).

El marcaje con el fluoróforo se preparó a razón de 10 μg de ITCF por μg de proteína durante 2 h a 30°C en oscuridad y agitación constante. La mezcla se dializó frente a tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15 para eliminar el exceso de fluoresceína. La proteína fluorescente fue utilizada en experimentos de ligamiento a clorobiontes.

7.3.2. Medida de fluorescencia

La medida de fluorescencia de la lectina no unida a los clorobiontes, la de aquella ligada a pared (desorbida con galactosa después), y la del interior celular se llevó a cabo usando un espectrofluorímetro Kontron SF25 (Kontron Instruments A6, Zurich, Switzerland) excitando las muestras con luz de 468 nm de longitud de onda, como máximo de excitación para el fluoróforo. La fluorescencia emitida fue medida a 512 nm (Legaz, *et al.*, 2004).

7.3.3. Desorción de la lectina marcada unida a pared celular

Las células tratadas con las enzimas α y β -galactosidasa se incubaron con la lectina marcada durante 2 h a 30°C en agitación constante. Las muestras se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 5 min y el precipitado se lavó varias veces con tampón fosfato 10 mM, pH 7,2 para eliminar la proteína marcada no unida a pared.

Las células fueron incubadas con 3 mL de una disolución de α -D-galactosa 100 mM en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15 durante 1 h a 30°C en oscuridad (Legaz *et al.*, 2004) para desorber la lectina marcada unida a pared. Las células fueron separadas por centrifugación y se midió emisión de fluorescencia en el sobrenadante como se indicó en el apartado anterior de fluorimetría.

7.3.4. Microscopía de Fluorescencia

El ligamiento de la lectina marcada con ITCF a los fotobiontes se visualizó en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 con una lámpara de mercurio U-RFL-T y un sistema de fluorescencia reflejada acoplados. El filtro de fluorescencia utilizado fue el requerido para el ITCF, con una longitud de onda de excitación azul de banda estrecha (NB) y $\lambda = 415$ nm.

El procesamiento de las muestras para microscopía de fluorescencia se hizo siguiendo el método de Heath (1987) con modificaciones. Las preparaciones fueron montadas en un cubreobjetos con 30 μ L de polilisina 1 μ M durante 12 h en un ambiente húmedo para evitar una excesiva desecación. Para ello, el cubreobjetos se colocó sobre una lámina de parafilm y a su vez, sobre una oblea de papel de filtro empapada en agua destilada en una caja cerrada. La polilisina no fijada se retiró con un capilar y a continuación se colocó una gota de la suspensión de células en cada cubreobjetos. Después de 2 h se retiraron las algas no fijadas.

Para el montaje de las preparaciones, se dispensó en un portaobjetos una gota de Mowiol-DABCO (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) para evitar el decaimiento de la fluorescencia y sobre éste se depositó el cubreobjetos con las células. La adquisición de imágenes se llevó a cabo mediante una cámara CCD acoplada al microscopio usando el programa Viewfinder Lite.

8. ENSAYOS DE LIGAMIENTO DE LA LECTINA FÚNGICA SOBRE CIANOBIONTES Y CLOROBIONTES

La arginasa segregada de *L. corniculatum* (10 μ g mL⁻¹) fue marcada con 100 μ g de ITCF (Molina *et al.*, 1993) y se mantuvo en oscuridad a 30° C de temperatura durante 2h. Tras ello, se dializó frente a tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15 para eliminar el fluorógeno sobrante. Las células de *Nostoc* recién aisladas a partir de muestras de 0,5 g de *L. corniculatum* se incubaron en la arginasa fluorescente (30 μ g de proteína) en un volumen final de 3 mL durante 1 h a 30° C en oscuridad. Las células fueron recogidas por centrifugación a 12.000 $\times g$ 15 min a 2° C para ser observadas por Microscopía de Fluorescencia.

Igualmente, clorobiontes aislados de talos de *E. prunastri*, previamente incubados con urea 40 mM en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15, o simplemente en tampón, fueron resuspendidos en esa misma disolución de arginasa de *L. corniculatum* marcada con ITCF. Esta mezcla de reacción se mantuvo una hora a 30° C en oscuridad y se observó con el microscopio de fluorescencia.

9. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA DE LAS ALGAS Y DE SUS COMPLEJOS CLOROFILA-PROTEÍNA EN PRESENCIA DE PUTRESCINA Y LA LECTINA FÚNGICA

La estabilidad del cloroplasto de los clorobiontes fue estudiada a dos niveles: un análisis de sus complejos clorofila-proteína mediante electroforesis capilar y en gel de poliacrilamida, y a través del cálculo de su contenido clorofílico y capacidad fotosintética. Para ello, los anteriores parámetros se midieron en algas recién aisladas de los talos de *E. prunastri* sometidas a distintas pruebas. Un lote de algas fue embebido en urea 40 mM durante 8 h, otro en arginasa liquénica (apartado 5.1. de Material y Métodos), también fue estudiada la combinación de estos dos tratamientos anteriores y, un último lote fue incubado en urea 40 mM primero, α -1,4-galactosidasa (5u mL⁻¹) después y arginasa en último lugar. Las incubaciones fueron de 2h a 30° C en agitación.

Para analizar las posibles alteraciones provocadas por putrescina se realizaron incubaciones de los clorobiontes en tampón fosfato potásico pH 7,2 conteniendo diferentes concentraciones de la diamina (5mM y 7mM) manteniéndolas durante 4h a 30° C.

El control para todos los tratamientos se obtuvo a partir de la incubación de las algas solamente en tampón fosfato potásico pH 7,2 en las mismas condiciones de tiempo y temperatura que tuvieran las muestras.

9.1. Medida de la capacidad fotosintética

Se partió de 3 g de talo para cada muestra y se aislaron los clorobiontes. Después de las distintas incubaciones, las algas fueron sometidas a una rotura mecánica de las paredes celulares con alúmina. Dicha alúmina se eliminó por centrifugación durante 20 min a $20.000 \times g$. La determinación del contenido en clorofila de las membranas tilacoidales se realizó mediante extracción en acetona al 80% (Polle *et al.*, 2000) y la concentración de Chl (a y b) en las muestras fue determinada según Arnon (1949) con las ecuaciones corregidas según Melis *et al.* (1987) para cada muestra incubada en distintas concentraciones de putrescina midiendo en cada caso la absorbancia a 649 y 665 nm.

$$[\text{Chl } a] (\mu\text{g mL}^{-1}) = 11,63 \times \text{Abs}_{665} - 2,39 \times \text{Abs}_{649}$$

$$[\text{Chl } b] (\mu\text{g mL}^{-1}) = 20,11 \times \text{Abs}_{649} - 5,18 \times \text{Abs}_{665}$$

La tasa fotosintética se cuantificó mediante la decoloración del DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol) (**Fig. 28**), un compuesto químico capaz de intercalarse en la cadena de transporte de electrones que cambia de color azul (forma oxidada y $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción a 600 nm) a incoloro cuando está reducido (no absorbe a 600 nm). Su potencial redox le permite captar electrones en distintos puntos de la cadena, de tal manera que la tasa fotosintética puede medirse según la decoloración del DCPIP en un sistema fotosintético. Los diferentes extractos se pusieron en contacto con el DCPIP y se fue midiendo la absorbancia a 600 nm cada minuto manteniendo la mezcla a 30 cm de un foco luminoso.

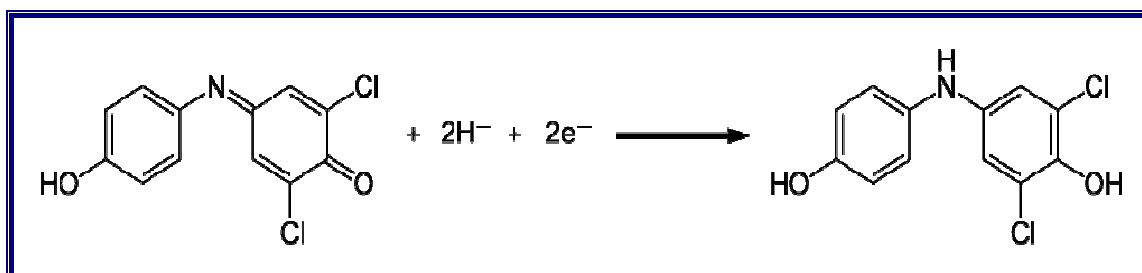


Figura 28. Molécula de DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), es un aceptor de electrones no fisiológico utilizado para medir el transporte de electrones en la fotosíntesis. En su forma oxidada es de color azul y absorbe a 600nm. Reducido es incoloro y no absorbe.

Las ecuaciones empleadas para la obtención de los resultados fueron:

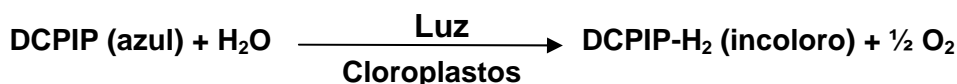
$$\text{Actividad } P_{680} = V_r / [\text{Chl } a + \text{Chl } b]$$

$$V_r = \text{Abs}_{600}^{t \text{ inicial}} - \text{Abs}_{600}^{t \text{ final}} / t$$

en UA mL min⁻¹ μg⁻¹, donde

V_r es la Velocidad de Reacción en UA min⁻¹.

Según Hill (1939), una suspensión de cloroplastos aislados puede desprender O₂ en presencia de luz si se suministra un compuesto oxidado capaz de aceptar electrones procedentes de la fotólisis del agua. En la hoja intacta, los principales aceptores naturales de electrones son la ferredoxina y el NADP⁺, pero se inactivan durante el proceso de aislamiento de los cloroplastos, por lo que, *in vitro*, estos aceptores naturales pueden sustituirse por el DCPIP cuyo color azul de la forma oxidada (quinona) se va decolorando lentamente cuando se reduce (fenol). La reacción que tiene lugar es la siguiente:



9.2. Espectros de absorción y fluorescencia

Los espectros de absorción de cada una de las muestras se adquirieron a partir de los extractos de acetona en un espectrofotómetro Unicam Heλios Alpha & Beta con 1,0 nm de integración de dato y 2,0 nm de ancho de banda. Los espectros de fluorescencia se recogieron en un espectrofluorímetro Kontron SF25 (Kontron Instruments A6, Zurich, Switzerland) con una integración de datos de 5 nm. El espectro de emisión se realizó desde 600 a 800 nm con una longitud de onda de excitación de 440 nm; los de excitación desde 400 a 600 nm y λ de emisión: 715 nm y 680 nm, respectivamente (Yamazaki *et al.*, 2006).

9.3. Aislamiento de los complejos clorofila-proteína

Las algas aisladas fueron sometidas a ruptura mecánica con alúmina (apartado 7.2.1. de Material y Métodos). Los restos de alúmina se eliminaron centrifugando a $3.200 \times g$ durante 10 min a 2° C.

Al sobrenadante se le añadió NaCl en una concentración de 15 mM, $MgCl_2$ 5mM y Triton X-100 al 0,05 % (ampliamente usado como surfactante para la recuperación de los componentes de membrana bajo condiciones no desnaturalizantes). Dicha disolución se mantuvo a 4° C durante 30 min y después se dializó frente a 5 L de tampón HEPES 20mM, pH 7,5, conteniendo sacarosa 0,4 M, $MgCl_2$ 5mM y NaCl 15 mM. Este procedimiento es una modificación del método descrito por Berthold y colaboradores (1981).

Una vez dializado, se añadió octilglucósido al 10 % para solubilizar las membranas tilacoidales y se mantuvo en agitación en hielo durante 5 min. Transcurrido este tiempo se centrifugó a $15.000 \times g$ durante 15 min a 2° C (Bassi y Simpson, 1987a, b) y el sobrenadante se utilizó para ser analizado por electroforesis, tanto capilar como en gel de poliacrilamida.

9.3.1. Separación de los complejos clorofila-proteína por EC

9.3.1.1. Preparación de las muestras para EC

Los complejos clorofila-proteína recién aislados de clorobiontes expuestos a los distintos tratamientos anteriormente explicados fueron congelados a -20° C inmediatamente después de su obtención. Se liofilizaron a -80° C y 10^{-2} mbar de presión de vacío para concentrar las muestras al máximo en un liofilizador Telstar Cryodos con una bomba de vacío acoplada Varian DS 102. Los liofilizados fueron resuspendidos en 300 μ L de tampón borato sódico 10 mM, pH 9,2.

Todos los reactivos utilizados se diluyeron en agua desionizada doblemente destilada y filtrada a través de un filtro Millipore GS de 0,22 μ m de diámetro de poro mediante el sistema Milli-Q™.

9.3.1.2. Acondicionamiento del capilar

El capilar se acondicionó con una secuencia de varios lavados a 60° C inyectando las diferentes soluciones a una presión de 20 psi (Legaz y Pedrosa, 1993). Un primer lavado con NaOH 1N durante 10 min, a continuación, un lavado con NaOH 0,1 N durante 30 min y un último lavado con agua ultrapura Milli-Q™ durante 30 min. El capilar se equilibró lavando con tampón borato sódico 25 mM, pH 9,2, durante 20 min y aplicando después un voltaje de 15 kV con el mismo tampón durante 30 min. Finalmente se añadió un lavado con agua ultrapura Milli-Q™.

La regeneración de la superficie del capilar entre separaciones fue llevada a cabo mediante lavados como se describe en la siguiente secuencia: NaOH 0,1N durante 5 min, agua ultrapura Milli-Q™ durante 5 min y tampón borato sódico 25 mM, pH 9,2, durante 15 min. Las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo a un voltaje constante de 11 kV aplicado de tal forma que la migración de los compuestos iónicos se producía desde el ánodo hasta el cátodo.

9.3.1.3. Condiciones de separación por EC

La separación de los complejos clorofila-proteína se llevó a cabo en un sistema P/ACE™ MDQ Glycoprotein System (Beckman Coulter, Inc. U.S.A.). El sistema cuenta con un detector Diode-Array incorporado con un ancho de banda de 6 nm. Los electroferogramas se obtuvieron mediante un ordenador acoplado al sistema utilizando el programa 32 Karat™, versión 7.0 de Beckman.

En el análisis mediante electroforesis capilar zonal se utilizaron capilares de sílice fundida recubiertos de poliimida (Beckman Coulter, Inc. U.S.A.) de 57 cm de longitud total, 50 cm de longitud efectiva, 75 µm de diámetro interno y 375 µm de diámetro externo. Como electrolito se utilizó tampón borato sódico 25 mM, pH 9,2 (Legaz y Pedrosa, 1993). El capilar se introdujo en un casete con objeto de facilitar su manejo y controlar estrictamente la temperatura.

Las muestras se inyectaron en el capilar ejerciendo una presión de 0,5 psi durante 5 segundos, lo que supuso un volumen de inyección de 0,9 nL aproximadamente. Durante la separación, la temperatura del capilar se mantuvo a 25° C y las muestras permanecieron a 10° C. Todas las separaciones se llevaron a cabo con un voltaje constante de 11 kV aplicado de tal forma que la migración de los

compuestos se producía de ánodo a cátodo. La detección “on column” se efectuó a 200, 280 y 435 nm, de tal manera que a 200 nm se detectan compuestos de diversa naturaleza, a 280 nm absorben compuestos de naturaleza proteica (absorción de los aminoácidos aromáticos tirosina, triptófano y fenilalanina) y a 435 nm las clorofilas, por ser uno de los máximos de absorción de la clorofila *a* (**Fig . 29**).

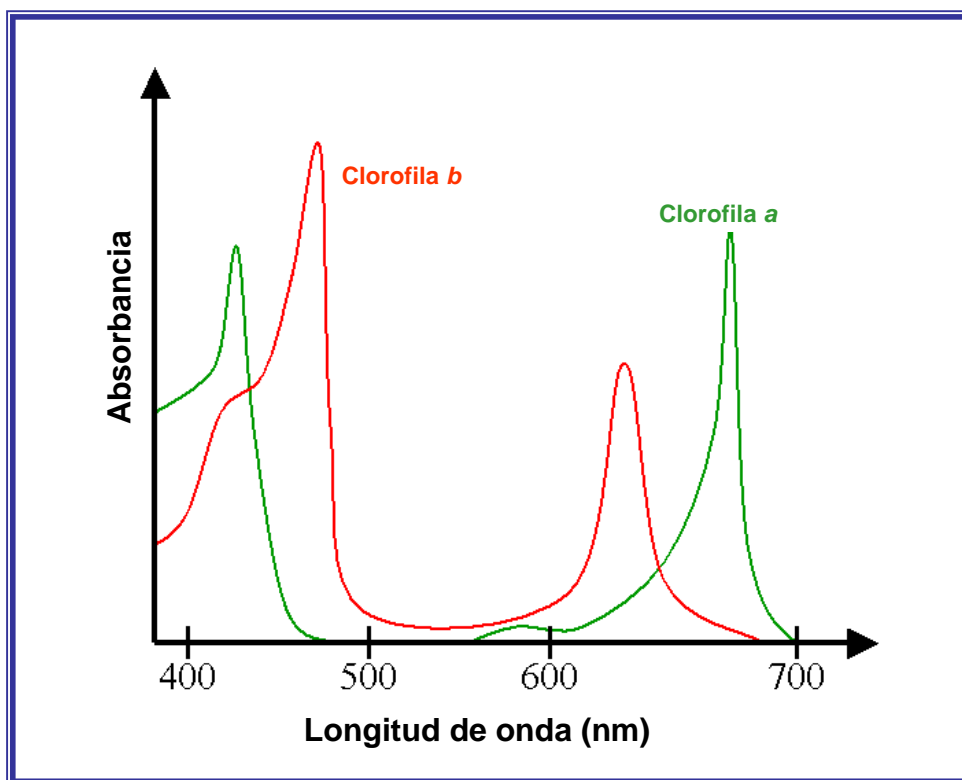


Figura 29. Espectro de absorción de las clorofilas *a* y *b* en metanol. La clorofila *a* presenta dos máximos de absorción: 435 y 660 nm. La clorofila *b* presenta sus dos máximos de absorción a 450 y 640 nm respectivamente.

Para cada pico obtenido en la separación se calculó el valor de la movilidad electroforética aparente corregida, μ_a , en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$, utilizando la expresión:

$$\mu_a = L \cdot l / t'_m \cdot V = 57 \cdot 50 / (t_m^{\text{solute}} - t_m^{\text{neutro}}) \cdot 11 \cdot 10^3 \text{ (cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1})$$

siendo *L*: Longitud total del capilar en cm; *l*: longitud efectiva (hasta la ventana) en cm; *t'*_m: tiempo de migración corregido (tiempo de migración del soluto menos el tiempo de

migración del soluto neutro) en segundos y V: la diferencia de potencial aplicada expresada en Voltios.

La migración de las moléculas en el capilar viene determinada por la relación carga masa ($Z^{+/-}/m$), de modo que las primeras sustancias detectadas, menor tiempo de migración, son las de menor peso molecular con carga eléctrica positiva. Les siguen las de una masa intermedia y luego las de mayor peso molecular con la misma carga. La zona neutra se encuentra en torno a los 8-9 minutos del análisis electroforético. A continuación saldrían las moléculas cargadas negativamente siguiendo el mismo orden según la masa.

9.3.2. Separación de los complejos clorofila-proteína por SDS-PAGE

La separación de los complejos clorofila-proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS (Laemmli, 1970) se llevó a cabo en un sistema Mini-PROTEAN® 3 de Bio-Rad con geles de 1 mm de grosor.

El gel separador contenía 2,5 mL de tampón Tris 1,5 M a pH 8,8, 100 μ L de SDS al 10 % (p/v), 3,3 mL de acrilamida-bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida) al 30 % (p/v), 4 mL de agua destilada y en el último momento se adicionaron 100 μ L de persulfato amónico al 10 % (p/v) y 4 μ L de TEMED.

Para el gel concentrante, preparado al 4%, se añadieron 0,67 mL de acrilamida-bisacrilamida al 30 % (p/v), 0,5 mL de tampón Tris 0,5 M a pH 6,8, 40 μ L de SDS al 10 % (p/v), 2,7 mL de agua destilada y por último 40 μ L de persulfato amónico al 10 % (p/v) y 4 μ L de TEMED.

Las muestras se cargaron en una disolución conteniendo tampón Tris 60 mM a pH 6,8, glicerol al 25 % (v/v), SDS al 2 % (p/v), azul de bromofenol al 0,01 % (v/v) y β -mercaptoetanol al 5 % (v/v). Se hirvieron a 95° C durante 5 min y se cargaron en el gel sometiéndolas a una corriente eléctrica de voltaje constante (170 V) durante 1 h. El

tampón de corrida contenía Tris 25 mM, glicina 0,2 M y SDS al 0,1 % (p/v), con un pH alrededor de 8,3.

Para determinar el peso molecular de las muestras se cargó la mezcla de proteínas patrón, también hervida durante 5 min, SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range de Bio-Rad que contenía Miosina (200 kDa), β -Galactosidasa (116,25 kDa), Fosforilasa b (97,40 kDa), Seroalbúmina (66,20 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Carbónico anhidrasa (31 kDa), Inhibidor de Tripsina (21,50 kDa), Lisozima (14,40 kDa) y Aprotinina (6,50 Da).

9.3.2.1. Revelado de los geles

Se realizó siguiendo el método desarrollado por Gottlieb y Chavko (1987) para la detección de ADN en geles de agarosa pero modificado químicamente para proteínas en geles de poliacrilamida con el kit de Bio-Rad Silver Stain PlusTM. En el proceso se siguieron tres pasos:

-Fijación: los geles se sumergieron durante 20 min en agitación en una solución de metanol al 50 % (v/v), ácido acético al 10 % (v/v), un concentrado de acelerador de fijación al 10 % (v/v) y agua destilada desionizada al 30 % (v/v).

-Lavado: Los geles se sometieron a dos lavados de 10 min en agitación con agua destilada desionizada.

-Tinción: La solución de tinción se preparó en el momento agregando distintas soluciones previamente preparadas de Na_2CO_3 al 2,5 % (p/v), NH_4NO_3 - AgNO_3 al 5 % (v/v), ácido tungstosilícico al 5 % (v/v) y formaldehído al 5 % (v/v). Los geles se sumergieron en dicha disolución hasta que las bandas se hicieron visibles sin sobrepasar los 20 minutos. Llegados a este punto la reacción se paró con una disolución de ácido acético al 5 % (v/v).

10. ESTUDIO MOLECULAR DE LA LECTINA FÚNGICA

La secuencia de aminoácidos de la arginasa segregable, tanto de *Evernia*, como de *Xanthoria*, se realizó mediante digestión enzimática de la proteína, una vez aislada y purificada. Por otra parte, se intentó aislar el oligonucleótido correspondiente a la lectina a partir del ADN aislado del micobionte en cultivo de *X. parietina*, entre otros, por medio de experimentos de amplificación, hibridación y clonaje.

10.1. Secuenciación de la arginasa

10.1.1. Purificación de la arginasa de *E. prunastri*

La arginasa segregable de *Evernia* (SAE) fue purificada de acuerdo con Legaz *et al.*, (2001). Se emplearon muestras de 50 g de talo líquénico, previamente secados al aire y después embebidos en 1250 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15 conteniendo L-arginina 40 mM durante 8 h a 26° C en oscuridad (Planelles y Legaz, 1987). Este medio fue filtrado a través de papel de filtro Whatman 3MM (W. & R. Blaston Ltd., Maidstone, UK), se concentró bajo un flujo de aire hasta 300 mL y se filtró con filtros Millipore GS (0,22 µm de diámetro de poro, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) y se precipitó inmediatamente con sulfato de amonio al 50 % (p/v).

La mezcla se dejó durante 2 h a 4° C y se centrifugó a $43.000 \times g$ 1h. El precipitado fue descartado, y el sobrenadante (conteniendo la actividad arginasa más alta) fue dializado durante 20 h frente a 5 L de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1 a 4° C. La proteína del dializado fue después adsorbida sobre un gel de fosfato de calcio, preparado según Legget-Bailey (1967) y equilibrada después con el mismo tampón a razón de 75 mg de gel seco por cada mg de proteína.

El eluato procedente del tampón Tris-HCl 0,14 M a pH 9,1 contenía la mayor actividad arginasa y fue pasado a través de una columna de intercambio iónico LKB 8100 (LKB, Bromma, Sweden) de 110 mL a 1000V y 4° C de temperatura. El gradiente de pH fue preparado al 1 % (p/v) de anfolitas (Servalyt, Serva, Feinbiochemica Co., Heidelberg, Germany), comprendido entre valores de pH 3,5 y 10. El gradiente de densidad se construyó con soluciones de sacarosa del 5 % al 50 % (p/v).

Las soluciones de los electrodos fueron de NaOH 1 M en el cátodo, y de H₃PO₄ 1 M en el ánodo. Las fracciones de 2 mL cada una, fueron recogidas para valorar la actividad arginasa y el valor de pI. La fracción eluida a pH 5,6 fue la de mayor actividad arginasa.

10.1.2. Purificación de la arginasa de *X. parietina*

Muestras de 15 g de talos de *Xanthoria* se incubaron en 150 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,1 conteniendo L-arginina 40 mM, durante 1 h a 26° C en oscuridad (Rodríguez y Vicente, 1991). La arginasa segregable (SAX) fue purificada de este medio de incubación según Molina y Vicente (2000), mediante precipitación con sulfato de amonio al 50 % de saturación, se adsorbió sobre un gel de fosfato de calcio (SAX fue desorbida con Tris-HCl 220 mM) y se filtró a través de una columna de Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Sweden) G-150 (30 cm de largo por 3 cm de diámetro interno), estabilizada con tampón Tris-HCl 220 mM a pH 9,1 (Planelles y Legaz, 1987).

10.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS de ambas arginasas

Ambas proteínas (SAE y SAX), purificadas a homogeneidad, se analizaron por PAGE-SDS según Laemmli (1970). Las proteínas se redisolviéron en tampón Laemmli conteniendo β-mercaptoetanol 50 μM. Las muestras se centrifugaron a 20.000 × g durante 15 min a 2° C y los sobrenadantes se dejaron hervir durante 5 min para después ser cargados en el gel.

El gel separador se preparó para un volumen final de 20 mL, añadiendo 7,5 mL de tampón Tris-HCl 1 M pH 8,8; 4,4 mL de agua destilada; TEMED al 8×10⁻⁴ % (v/v); persulfato amónico al 0,037 % (p/v); acrilamida-bisacrilamida al 12 % (p/v) y SDS al 0,1 % (p/v). El gel concentrante contenía 1,25 mL de tampón Tris-HCl 1 M pH 6,8; 6,9 mL de agua destilada; TEMED al 0,001 % (v/v); persulfato amónico al 0,04 % (p/v); acrilamida-bisacrilamida al 5 % (p/v) y SDS al 0,1 % (p/v). El tampón de corrida empleado fue Tris-glicina 50 mM, pH 8,3 conteniendo SDS al 0,1 % (p/v) y como patrón de masa molecular se empleó la mezcla SeeBlue 2 plus (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA). La corriente se mantuvo constante a 180 V y 25 mA a 4° C de temperatura. Las proteínas fueron reveladas con azul coloidal Coomassie (Gel Code Blue stain reagent, Pierce, Rockford, IL, USA). Finalmente, el gel fue secado a vacío y escaneado después.

10.1.4. Digestión enzimática y análisis de la secuencia

Las bandas resultantes en los geles de poliacrilamida correspondientes a SAE y SAX fueron digeridas proteolíticamente con tripsina. Los péptidos extraídos se analizaron después en un espectrómetro de masas MS Reflector Spectrometer 4700 (Termo) en modo tándem MALDIT OF/TOF. Esta última es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de proteínas y se denomina MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI (Time Of Flight, analizador del tiempo de vuelo).

El primer análisis de las bandas de los péptidos, después de filtrar los resultados para eliminar los picos correspondientes a la tripsina, fue utilizado para lograr una primera identificación de los péptidos utilizando MASCOT como herramienta esencial de análisis comparado frente a la base de datos de proteínas SWISSPROT.

10.2. Oligonucleótido de Arginasa

Los procedimientos llevados a cabo para obtener un oligonucleótido de la lectina siguieron el siguiente esquema.

- Extracción de ADN
- Amplificación por PCR
- Electroforesis en gel de agarosa
- Clonaje de los productos de PCR
- Limpieza de productos de PCR
- Secuenciación

10.2.1. Extracción del ADN

La extracción del material genético de micobiontes se realizó mediante precipitación con tampón CTAB (Bromuro de cetil-trimetilamonio) (Cubero *et al.*, 1999).

Composición del tampón de extracción:

- CTAB 1 % (p/v)
- NaCl 1 M
- Tris-HCl 100 mM, pH 8
- EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 20 mM
- PVPP (Polivinilpirrolidona) 1 % (p/v), añadida a las muestras en el momento de la extracción.

Las colonias fúngicas procedentes de cultivo axénico se recogieron en tubos de 1,5 mL en condiciones estériles y se maceraron hasta llegar a homogeneización con 400 μ L de tampón de extracción CTAB. Asimismo se añadieron 1,5 μ L de Proteinasa K (EC 3.4.21.64) para inhibir posibles nucleasas en disolución. La mezcla se dejó 1 h a 55° C con una agitación de 520 r.p.m. en un agitador TS-100 Thermo Shaker Gkisker y después se digirió con 2 μ L de RNasa A (EC 3.1.27.5) (10 μ g / μ L) durante 30 min a 37° C.

La purificación se realizó con el mismo volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1 v/v) o cloroformo puro y se mezcló agitando vigorosamente, sin usar vórtex (Cubero y Crespo, 2002). La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 10.000 $\times g$.

Llegados a este punto, los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa superior y el cloroformo arrastra el *debris* celular y la mayoría de las proteínas a la interfase. La PVPP unida a compuestos polifenólicos también se disuelve en el cloroformo y precipita en el fondo. Por tanto, la fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo y el precipitado se descartó.

La fase acuosa se diluyó en tres volúmenes de tampón de precipitación para disminuir la concentración de NaCl y se mezcló durante 2 min. La mezcla se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min a 10.000 $\times g$.

Composición del tampón de precipitación:

- CTAB 1 % (p/v)
- Tris-HCl 50 mM, pH 8
- EDTA 10 mM
- NaCl 40 mM

El precipitado se resuspendió en 350 μ L de NaCl 1,2 M, al que se añadió un volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1 v/v) y la fase acuosa se descartó. Se mezcló vigorosamente y se centrifugó 5 min a $10.000 \times g$. La fase superior se llevó a un nuevo tubo y se mezcló con 0,6 volúmenes de isopropanol. Se mantuvo 15 min a -20° C y después se centrifugó a 4° C durante 20 min a $13.000 \times g$.

El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70 % para eliminar el exceso de sales y tras centrifugar durante 3 min a $13.000 \times g$ y 4° C de temperatura, el precipitado resultante se secó en una centrífuga de vacío a 50° C. El ADN extraído se resuspendió en 50 μ L de agua ultrapura Milli-Q™ para ser usado como ADN molde en la reacción de PCR.

10.2.2. Amplificación por PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de la polimerasa) se realizó según Arup (2002), en un termociclador My Cyclyer™ thermal Cyclyer de Bio-Rad. Todos los ingredientes de la mezcla de reacción se mantuvieron en hielo y se manipularon con guantes para prevenir posibles contaminaciones.

La solución de partida se preparó en un tubo *ependorf* de 0,5 mL con un volumen final de 50 μ L conteniendo:

- 5 μ L de tampón específico de la polimerasa
- 2,5 μ L de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) en una concentración de 0,8 -1 mM a pH 7.
- 2,5 μ L de cada cebador, uno en dirección 5' -> 3' (*forward*) y otro en dirección 3' -> 5' (*reverse*), en una concentración 10 μ M. Cuando los cebadores que se utilizaron fueron los que se diseñaron experimentalmente se añadieron 5 μ L, el doble de volumen, por ser menos específicos.

- 4 μL Mg^{2+} , agregados como MgCl_2 si el tampón de la polimerasa no lo contenía, en una concentración de 1,5 mM para 0,8 mM de dNTPs
- 2 μL de DNA molde diluido en un 5 % (v/v) del ADN aislado según se indica en el apartado anterior.
- 0,2 μL de enzima polimerasa (1 - 2,5 unidades por cada 100 μL).
- Agua destilada hasta completar los 50 μL según se hubiera adicionado MgCl_2 o no y según el volumen de cebadores necesario en cada reacción.

Las fases de la PCR se muestran en la **figura 13** y fueron las siguientes:

- Precalentamiento inicial a 95° C durante 4 min, debido a que los ingredientes de la mezcla de reacción estaban previamente almacenados a -20° C.
- Desnaturalización: Separación de las hebras de ADN durante 45 s a 95° C.
- Hibridación de los cebadores a la hebra de ADN. Se probaron varios gradientes de temperatura entre 50° C y 55° C ya que, en un principio, no se conocía la temperatura específica de unión de los cebadores diseñados experimentalmente. Esta etapa se programó para 1 min de tiempo
- Extensión de los cebadores a 72° C durante 1 min, temperatura a la cual la polimerasa presentaba su máximo de actividad (100 pb/min), aumentando geométricamente la cantidad de fragmentos de ADN en la muestra. Los últimos tres pasos (desnaturalización-hibridación-extensión) constituyen un ciclo que se repitió 35 veces consecutivas.
- Elongación de los fragmentos a 72° C durante 5 min.
- Conservación de los productos de PCR a 4° C.

10.2.2.1. Diseño de los cebadores

La construcción de los cebadores se realizó a partir de secuencias de ARNm de varias arginasas fúngicas publicadas en la base de datos NCBI GenBank mediante su alineación y eligiendo después las más conservadas. Dichas secuencias fueron:

- XM_001271143 de *A. clavatus*:

```
ATGACGTCTCCATCGACCATCAAGCAACGGTTTCTCTCCAAGTCGAATGAGCTCGGCGTGGTGGCAGTCGGATTCA
ACGGTGGTCAGTCAAACTCGGTGTCTGAAGCTGCTCCCTCGCCTTGATCGAAGCCGGTCTTCTGAATCAAGTCC
GCGATGACCTGGGCTACGACGTTCACTATGACGACACCGTACATTCTACGAGAACCCTCACTCCCATGAACGATCC
CGACCACCGGGGCATGAAGAAGCCGCGCGGGGTGAGCATCGCAACCGAGACGATCAGCAAGCAGGTGTACGAG
CACGCCAAGGACGGCAAGTTCGTGCTGACCCTCGGCGGCGATCACTCGATCGCCATCGGGACCATTTCCGGCAC
GGCCAAGGCCATCCGCGAGCGCCTGGGGCGGAGATCGCGGTGATCTGGGTGATGCGCACGCCGACATCAAC
ACGCCGGAGATGAGCCCCAGCGGTAACATTACGGGATGCCATGGCTTTCTTGACGAGGCTGGCCCGCGAGGA
CAAGAAAGATATCTTTGGGTGGTTGGAGGATGATCATTGTCAACAAGAACAAGCTGGTATACATCGGTTTGGCG
GATGTGATCGTGGCGAGAAGCAGTTGCTCCGGGAGCACGGTATCAAGGCGTTCAGCATGCATGATATTGACCGA
```

TATGGAATCGGCCGGGTTGTGCAAAATGGCTCTAGCCACATTGGCAACGACACTCCCATCCACCTCTCGTTTCGATG
TTGATGCCCTGGACCCCAAGTGGGCCCCAGCAGGTACCCCGTCCGCGGTGGGTTGACTCTGCGAGAAGGT
GACTTCATCTGCGAGTGTGTCCACGAGACAGGTAATCTGGTTGCCATGGATCTGGTTGAGGTCAACCCAGTCTGG
AAATCGTTGGCGCGTCAGAAACCATCCGGGCCGGCTGCTACTGGTACGGTGTGCATTGGGAGATACACTTTTGT
GA

- gi|119491650|ref|XM_001263319.1| *Neosartorya fischeri* NRRL 181 arginase, putative (NFIA_065870) mRNA, complete cds

ATGACAGCGCCATCAACTATCAAGCAAAGATTCTGTCCAAGCCAAATGAGCTGGGCGTGGTTCGCTGTTCGGATTTA
ACGGTGGTCAGTGCAAACCTAGGCGTGAAGCAGCCCGCTCGCCTTGATTGAAGCCGGTCTTCTGAATCAAGTGC
GCGACGACCTGGGCTACCACTTCACTATGACGACACCGTGCCTACTACGAGAGCCTGACCCCATGAGCGATC
CCGATCACCGGGGATGAAGAAGCCGCGCGCGCTGAGCGTTGTGACCGAGACGCTCAGCAAGCAGGTCTACGAC
TACGCCAAGGACGGCAAGTTCGTCTCACGCTAGGCGGCGACCACTCGATCGCCATCGGCACCATCTCCGGCAC
GGCCAAGGCCATCCGGGAGCGACTGGGCCGCGAAATGGCGGTCTGTTGGTTCGATGCGCATGCCGATATCAACA
CGCCGGAGATGAGCCCCAGCGGGAACATCCACGGCATGCCATGGCCTTCTTGACGCGACTGGCCCGGGAGGAC
AAGAAGGATATTTTCGGGTGGTTGCAGGATGAGCACATCATCAACAAGAACAAGCTGGTGTACATCGGTCTGCGGG
ATGTGGACCGCGCGGAGAAGCAGCTGCTGCGGGAGCATGGTATCAAGGCATTGAGCATGCATGACATTGACAGAC
ATGGAATCGGTGCGCTGGTTGAAATGGCGCTCGCTCACATCGGCAACGACACCCCATCCATCTCTCGTTTCGACG
TTGACGCTTGAGCCCTCAATGGGCCCTAGCACAGGCACTCCCGTCCGTGGAGGTCTGACTCTGCGTGAGGGTG
ACTTCATCTGCGAATGTGTTACGAGACTGGCAACTTGGTGCCTATGGATCTGGTAGAGGTCAACCCAGCCTGGA
GGAAGTCGGTGCTTCAGAGACCATCCGAGCCGGTTGCTCTTTGGTGCGTTGCGCACTGGGCGACACACTGCTGTG
A

- gi|70999513|ref|XM_749383.1| *Aspergillus fumigatus* Af293 arginase (Afu3g11430) partial mRNA

ATGACAGCGCCGTCGACTATCAAGCAAAGATTCTGTCCAAGCCAAATGAGCTGGGCGTGGTTCGCTGTTCGGATTTA
ACGGTGGTCAGTGCAAACCTAGGCGTGAAGCAGCCCGCTCGCCTTGATTGAAGCCGGTCTTTTGAATCAAGTGC
GCGACGACCTGGGCTATCACTTCACTATGACGACACTGTGCTACTACGAGAGCCTGACCCCTTGAGCGACC
CCGACACCGGGGATGAAGAAGCCGCGCGCGTCAAGCTGCTGACGAGAGCCTCAGCAAGCAGGTCTACGAC
TACGCCAAGGACGGCAAGTTCGTCTCACACTAGGCGGCGACCACTCGATCGCCATCGGCACCTATCTCCGGCAC
GCCAAGGCCATCAGGGAGCGACTGGGCCGGGAAATGGCGTTATCTGGTTCGATGCGCATGCCGATATCAACAC
GCCGGAGATGAGCCCCAGCGGAAACATCCACGGCATGCCATGGCCTTCTTGACCCGGCTGGCCCGGGAGGACA
AGAAGGATATCTTCGGGTGGTTGCAGGATGAGCACATCATCAACAAGAACAAGCTGGTGTACATCGGCCTGCGGG
ATGTGGACCGCGGCGAGAAGCAGCTGCTGCGGGAGCAGCTTCAAGGCATTTAGCATGCATGACATCGACAGAC
ATGGAATCGGCCGCGTGGTTGAAATGGCGCTCGCTCACATCGGCAACGACACCCCATCCATCTCTCGTTTCGACG
TTGACGCTTGAGCCCTCAATGGGCTCCTAGCACAGGCACTCCCGTCCGTGGAGGTCTGACTCTGCGTGAGGGTG
ACTTCATCTGTGAATGTGTTACGAGACTGGCAATTTGATCGCCATGGATCTGGTAGAGGTCAACCCAGCCTGGA
CGAAGTCGGTGCTTCAGAGACCATTCGAGCCGGTTGCTCTTTGGTGCGGTGCGCACTGGGCGACACACTGCTGTG
A

- gi|115396435|ref|XM_001213857.1| *Aspergillus terreus* NIH2624 arginase (ATEG_04679) mRNA, complete cds

ATGACGCGCCTTCCACTATCAAGCAAAGATTCTCTCCAAGCCCAACCAGCTGGGCGTGGTTCGCGTGGGCTTC
AACGGCGGCCAGTGCAAACCTGGCGTTGAAGCCGCCCCCATGGCCTTGATCGAAGCTGGTCTTCTCACTCAGCTC
CGCGAGGACCTCGGGTACGACCTGCACTATGACAACACCGTTCACTACTACGAAAACACATCCCTGCGTCAGAC
CCGACCCACCGGGGATGAAGAAACCCCGCACCGTGAGCGCGGTGACGGAGACGCTGAGTACGCAGGTCTACAA
CCAGGCAAGGCGCAAGTTCGTGCTCACCCTCGGTGGCGACCACTTCATCGCCATTGGTACCATCTCCGGCTC
CGCGAAGGCCACCGCGAGCGGTTGGGCCGCGAGCTGGGCGTCATCTGGGTGACGCCCCATGCCGACATCAAC
GTGCCGAGATGAGCCCCAGCGGAACATCCACGGCATGCCATGGCCTTCTTGACCCGTCTGGCCCGTGAGGA
GAAGAAGGACATCTTCGGCTGGTGCAGGATGAGCATCTCGTGAACGTGAACAAGCTGGTGTATATCGGTCTGCG
CGATGTGACCGCGGTGAGAAGCAGCTCCTGCGGCAACACGGCATCAAGGCCTTCAGCATGCAGATGTCGACC
GTTATGGTATCGGTGCGGTGCGAGATGGCCCTGGCACACATTGAAACGACACCCCATCCATCTCTCGTTTCG
ATGTGATGCGCTAGACCCGCTCTGGGCCCCAGCACGGGTACCCCGTGGTGGCGGTCTGACTCTTCGTGAG
GGTGACTTTATCTGCGAATGCGTGCACGAGACGGGCAACCTGGTGGCGATGGACTTGGTTCGAGGTCAACCCGAG
CCTGGAGGAGAAGGGCGCATCGGAGACTATCCGCACGGGATGTTCTGTTGGTTCGTTTCGGCTCTGGGTGACACCT
TCTGTGA

- gi|67524886|ref|XM_655413.1| *Aspergillus nidulans* FGSC A4 arginase (AN2901.2), mRNA

ATGACTTCGCCCTCGACTATCAAGCAGAGATTCTCTCCAAGCCAAACCAGCTCGGCGTAGTTGCTGTTGGTTTTA
ATGGCGGCCAGTGCAAGCTTGGCGTTGAGGCAGCTCCTATGGCTCTCGTCGAGGCCGGCCTTCTCGACAGCTTC
GCGATGATCTTGACTACGAAATACACTACGATAACACCGTACACTACTATGAGAAGGAGATCCCCGCTGAAGACCC

CGACCACCGGGGCATGAAGAAGCCGCGGGCTGTCAGCGCCGTCACAGAAACCCTCAGCTCGCAGGTGTACGAGC
 ACTCCAAGGAGGGCAAGTTCACGCTAACCCTAGGCGGAGACCACTCGATCGCAATTGGGAGTATCTCCGGCATTG
 CAAAGGCGACGCGCGAGCGGGCTGGGACGGGAGATTGGTGTCAATTTGGGTCGATGCGCATGCTGATATCAACATT
 CCGAAATGAGTCCCAAGTGGGAATATCCACGGAATGCCGATGGCATTCTTGACGCGGTTGGCGACGGAGGAGAAGA
 AGGATATCTTTGGTTGGTTGCAGGAGGAGCACAAGGTCAACCTCCGCAAGCTGGTGTATATCGGACTGAGAGATGT
 TGATCGCGGTGAGAAGAAGTTGCTCCGGGAGCATGGAATCAAGGCGTTTAGCATGCATGATGTTGATCGCCACGG
 TATTGGTCGAGTGGTCGAAATGGCCCTCGCTCACATCGGAAACGACACCCCAATCCATCTGTCCTTTGACGTGGAT
 GCACTCGATCCCCAATGGGCGCCCAGCACTGGAACGCCGGTGCGTGGGGGTTTGACTCTTCGCGAGGGAGACTT
 CATCTGCGAGTGTGTTACGAGACAGGAACTTGATCTCCATGGATTTGGTTGAGGTCAACCCAGCTTGGAAGCT
 GTGGGGGCTTCCGACACCATTCGGACCGGTTGCTCGTTGGTGCCTAGTGCCTTGGGAGATACCCTGCTCTAG

Una vez diseñados fueron enviados al servicio de secuenciación Eurofins MWG GmbH resultando las secuencias siguientes:

Arg_for_310 5'→3' $T_m = 60,4^\circ$ C: 5'-ACK CCA AGG ASG GCA AGT TC-3'

Arg_for_310 5'→3' $T_m = 57,7^\circ$ C: 5'-AC K CCA AGG ASG GCA AGT T-3'

Arg_rev2_730 5'→3' $T_m = 58,3^\circ$ C: 5'-AGR TGG ATK GGR GTG TCG TT-3'

Arg_rev1_880 5'→3' $T_m = 59,5^\circ$ C: 5'-CTS CCC TTG ACC TCD ACC A-3'

Donde T_m (*melting temperature*) es la temperatura óptima de hibridación, la cual no debería ser muy diferente de la temperatura de hibridación o emparejamiento ($T_a = T_m - 5^\circ$ C) y se calcula en función de las pares de bases (Arup, 2002):

$$T_m = 2^\circ \text{ C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^\circ \text{ C} \times (\text{G} + \text{C})$$

Las letras D, K, R y S en las secuencias de los cebadores representan algunas bases de ADN en esta posición. D= G, A ó T; K= G ó T; R= A ó G; S= G ó C.

10.2.2.2. Combinaciones de los cebadores y gradientes de temperatura en la fase de Hibridación

Las distintas combinaciones de los cebadores probadas para hibridar con el ADN aislado del componente fúngico de *Lecanora muralis* y *Xanthoria parietina* en reacciones de PCR fueron:

- 1) Arg forward 1-310 / Arg reverse 2-730
- 2) Arg forward 1-310 / Arg reverse 1-880
- 3) Arg forward 2-310 / Arg reverse 2-730
- 4) Arg forward 2-310 / Arg reverse 1-880

Los distintos gradientes de temperaturas que se probaron desde 50° a 55° pasaron por seis posibles valores, tantos como permitía el termociclador: 50° C, 50,9° C, 51,7° C ó 52° C, 53° C, 54° C, 55° C.

Además se probaron distintas enzimas polimerasas, cada una con unas condiciones específicas:

- *Taq* ADN Polimerasa de Biolabs, con $MgCl_2$ incluido en el tampón.
- *Taq* ADN Polimerasa de Fermentas: conteniendo KCl ó $(NH_4)_2SO_4$ en su tampón y sin Mg^{2+} añadido. En este caso hubo que incorporar $MgCl_2$ en la mezcla de reacción. Esta polimerasa añadía una cola de adeninas al final, por tanto se dejó actuar durante 15 min en lugar de 5 min en la fase de extensión a 72°C.
- GoTaq[™] ADN Polimerasa de Promega (Glebs *et al.*, 2003), cuyas condiciones de PCR fueron ligeramente distintas: precalentamiento a 95° C durante 2 min; desnaturalización a 94° C durante 30 s; hibridación a 54,5° C durante 1 min y extensión a 72° C durante 1 min. Los tres últimos pasos fueron repetidos 35 veces.

10.2.2.3. PCR anidada

La PCR anidada o *nested* fue necesaria para amplificar pequeñas cantidades de ADN molde. Esta técnica requirió dos amplificaciones consecutivas; el producto de la primera PCR realizada con los dos cebadores más externos, fue usado como ADN molde para la siguiente reacción con los otros dos cebadores más internos (**Fig. 30**). La primera reacción se visualizó por electroforesis en gel de agarosa y se extrajo la banda de interés para ser utilizada como ADN molde en la segunda PCR.

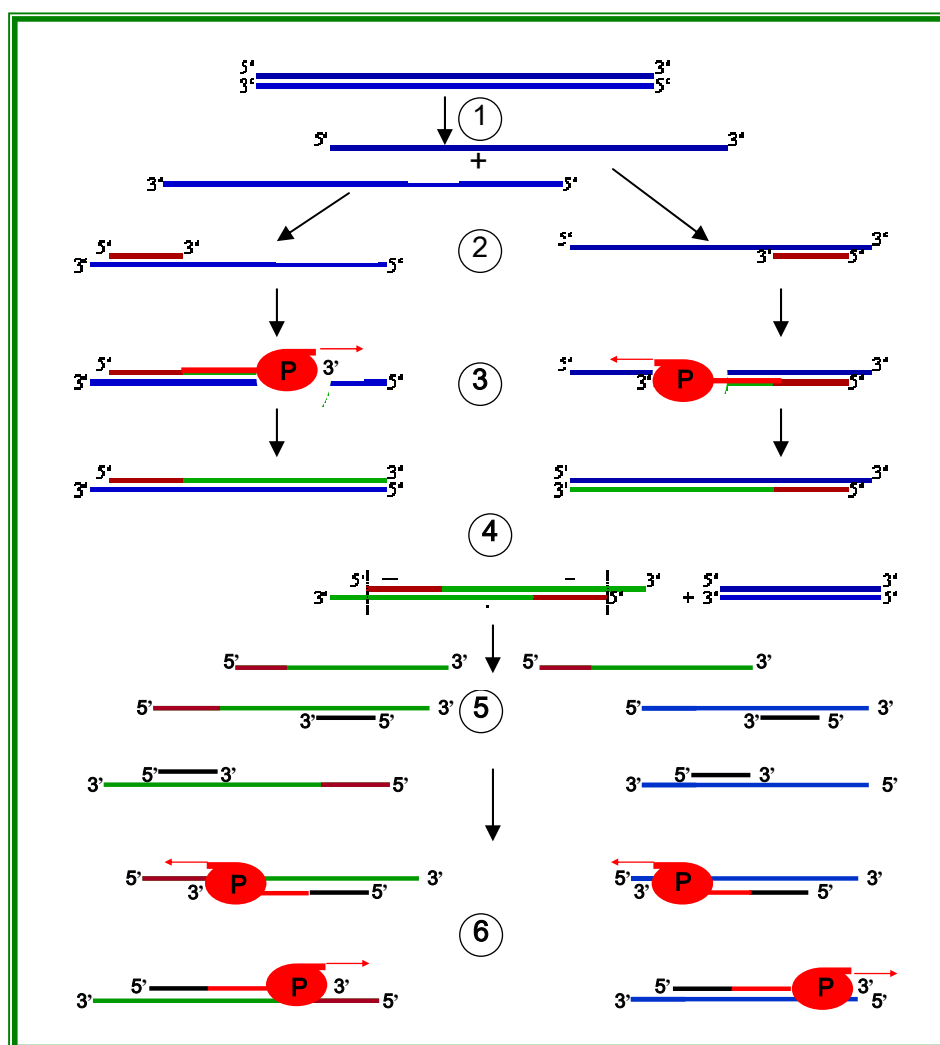


Figura 30. Esquema de la PCR anidada. (1) Desnaturalización. (2) Hibridación de los cebadores externos (en rojo). (3) Extensión. (4) Elongación. (5) Separación de las hebras del ADN molde e hibridación de los cebadores más internos (en negro). (6) Extensión. P= polimerasa.

10.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

Las moléculas de ADN resultantes de la PCR se cargaron en un gel de agarosa, teñidas con bromuro de etidio y se sometieron a un campo eléctrico en el que el ADN, negativamente cargado, migró hacia el ánodo con una movilidad dependiente del voltaje aplicado, la concentración de agarosa en el gel y el tamaño de la molécula.

Los geles fueron preparados al 1 % de agarosa disuelta en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Sambrook *et al.*, 1989), hirviendo dicha mezcla en un microondas hasta su completa disolución (Arup, 2002). Tras añadir bromuro de etidio (2-3 μ L por cada 100 μ L de agarosa) se vertió en el molde evitando la formación de burbujas de aire y se dejó solidificar, 40 min aproximadamente.

Composición del tampón TAE (50 \times):

- Tris 242 g, ajustar a pH 8
- 57,1 mL de ácido acético glacial
- 100 mL de EDTA 0,5 M
- Agua bidestilada hasta 1L

El gel se depositó en el tanque y se cubrió totalmente con el mismo tampón. Las muestras se cargaron ya mezcladas con el tampón de muestra conteniendo un marcador del frente, azul de bromofenol o xileno cianol al 0,25 % p/v, y glicerol al 50 % v/v (Loading Dye 6 \times , Fermentas). El marcador de pesos moleculares GeneRuler™ and O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladders (100-3000 bp), o bien, GeneRuler™ and O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladders (250-10000 bp) de Fermentas, se cargó junto con las muestras en el mismo tampón. El voltaje permaneció constante a 90 V durante 30 min. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta acoplado a un programa para modificar las imágenes en el momento (Gel Doc X gel imaging system, Bio-Rad).

10.2.4. Clonaje de los productos de PCR

El clonaje de los productos de PCR fue necesario en los casos en los que no se obtuvo un solo amplicón. Una vez elegidos los productos de PCR mejor amplificados se mezclaron 2 μ L de la mezcla de reacción con 0,5 μ L de una solución

salina y con 0,5 μ L del plásmido pCR[®] 4-TOPO[®] vector (Invitrogen) (**Fig. 14**). Se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente y después se depositaron en un vial con 25 μ L de células *Escherichia coli* competentes (DH5 α TM-T1^R Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen) en hielo durante 30 min.

Las células se sometieron a un golpe de temperatura, 30 s a 42° C sin agitación e inmediatamente se transfirieron al hielo añadiendo 250 μ L de medio S.O.C. (Hanahan, 1983) cuyos ingredientes son:

- | | | |
|---|---|-----------------|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Triptona al 2 % (p/v) ▪ Extracto de levadura al 0,5 % (p/v) ▪ NaCl 10 mM ▪ KCl 2,5 mM ▪ MgCl₂ 10 mM ▪ MgSO₄ 10 mM ▪ Glucosa 20 mM | } | Ajustado a pH 7 |
|---|---|-----------------|

Se mantuvo 1 h en agitación a 37° C y después se sembraron dos volúmenes distintos (50 y 100 μ L) de la suspensión para asegurar la separación de las posibles colonias al menos en una de ellas, sobre sendas placas, previamente atemperadas a 40° C, con medio LB (Lysogeny Broth) (Bertani, 1951) con Ampicilina (35 μ g/mL) y 40 μ L de X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-galactósido) añadido en el último momento. Se incubaron a 37° C hasta que crecieron colonias blancas y azules (menos de 24 h). Los ingredientes del medio LB son:

- | | | |
|---|---|-----------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • Triptona 10 % (p/v) ▪ Extracto de levadura 5 % (p/v) ▪ NaCl 10 mM | } | Ajustado a pH 8 |
|---|---|-----------------|

Los clones bacterianos obtenidos fueron seleccionados según el siguiente criterio de discriminación:

- ✓ Colonias azules: correspondientes a bacterias que se transformaron con el plásmido no recombinante, es decir, sin inserto del ADN de la PCR inicial, dado

que al ser resistentes a la ampicilina crecieron en el medio pero metabolizaron el X-gal por tener el gen lac Z intacto.

- ✓ Colonias blancas: aquellas bacterias transformadas con el plásmido recombinante, es decir, con el fragmento de ADN inserto en él, por tanto sin actividad β -galactosidasa (sin degradación del X-gal) pero resistentes al antibiótico.

Las colonias blancas fueron recogidas directamente para amplificar el inserto del plásmido por PCR (PCR del clonaje con cebadores específicos del vector, M13 *forward* y M13 *reverse*) y, por último, purificarlo y secuenciarlo. La temperatura inicial de la fase de desnaturalización fue suficiente para romper la membrana celular de las bacterias y liberar los plásmidos que actuarían como ADN molde en la reacción de amplificación sin necesidad de aislar los fragmentos previamente.

10.2.5. Limpieza de productos de PCR y Secuenciación

Al visualizar el gel resultante de la PCR se observaron restos de cebadores, aceites minerales y sales de los tampones, nucleótidos no incorporados e incluso restos de la ADN polimerasa termoestable en el frente de la electroforesis, sustancias susceptibles de inhibir reacciones enzimáticas posteriores como las de secuenciación.

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo en tubos de polipropileno con dos capas de fibra de vidrio acopladas para filtrar las muestras en presencia de un tampón formado por: tiocianato de guanidina 3 M, tampón Tris-HCl 10 mM y etanol al 5 % a un pH 6,6 (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche). El precipitado se lavó varias veces con un tampón conteniendo etanol al 20 %, NaCl 20 mM y Tris-HCl 2 mM a pH 7,5. Finalmente, el ADN se eluyó de los filtros mediante Tris-HCl 10 mM a pH 8,5 y centrifugación a $13.000 \times g$ durante 1 min.

Sin embargo, este proceso de purificación no aseguraba la totalidad de la pureza de los productos de PCR ya que, en ocasiones la recuperación de ADN era baja por la coelución de éste con las fibras de vidrio o incluso con etanol. Fue necesario, por tanto, realizar otra PCR. En el caso de que las bandas fueran débiles, las muestras fueron concentradas en una de vacío durante 2 min a 45° C.

Una vez purificados los productos de PCR y cuantificados midiendo absorbancia a 260 nm (Brunauer *et al.*, 2007) se mandaron al servicio de secuenciación Macrogen para después comparar con la base de datos NCBI (National Center Biotechnology Information) utilizando la herramienta BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Altschul *et al.*, 1997).

10.2.5.1. Extracción de bandas de geles de agarosa

Para la extracción de bandas, los geles se prepararon al 1,2 % de agarosa y el molde para los pocillos fue más grande. Esta vez se cargaron 100 µL de muestra y una vez acabada la electroforesis, el gel se expuso bajo una lámpara de luz ultravioleta para visualizar las bandas. Con ayuda de un bisturí estéril se extrajo la banda de interés minimizando el volumen de agarosa alrededor de la misma y se pesó a continuación para calcular la cantidad de reactivos necesarios para disolver la agarosa.

La porción de gel se mezcló con un tampón de mezcla a razón de 300 µL de tampón por 100 mg de agarosa extraída en un tubo *ependorf* durante 10 min a 56° C, agitándolo cada 2-3 min. El tampón de mezcla contenía: tiocianato de guanidina 3 M, tampón Tris-HCl 10 mM y etanol al 5 % a un pH 6,6. Después se añadieron 150 µL de isopropanol por cada 100 mg de agarosa y tras agitarlo nuevamente se depositó en un tubo de polipropileno con un filtro de lana de vidrio acoplado. Se centrifugó a la máxima velocidad durante 30-60 s y se descartó la solución sobrante.

A continuación se añadieron 500 µL de tampón de lavado, conteniendo etanol al 20 %, NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM a pH 7,5 y se centrifugó otra vez. El lavado se repitió con 200 µL de tampón de lavado y por último se eluyó el contenido del filtro con Tris-HCl 10 mM a pH 8,5.

RESULTADOS

1. DETECCIÓN CITOQUÍMICA DE UREASA DE CLOROBIONTES

Los clorobiontes aislados a partir de talos de *E. prunastri*, recolectados en primavera o en otoño, fueron resuspendidos en 3 mL de agua destilada conteniendo urea 40 mM durante 2 h a 30 °C. Después, las algas fueron recogidas por centrifugación y procesadas para la detección citoquímica de ureasa en la pared celular.

Las algas obtenidas de los líquenes recolectados en Noviembre (**Fig. 31B**) produjeron depósitos de CoS en la pared celular, tras la reacción histoquímica, más oscuros y densos que aquellos encontrados en los líquenes recogidos en Mayo (**Fig. 31D**), aunque la incubación previa con urea intensificó la detección de ureasa en ambos casos.

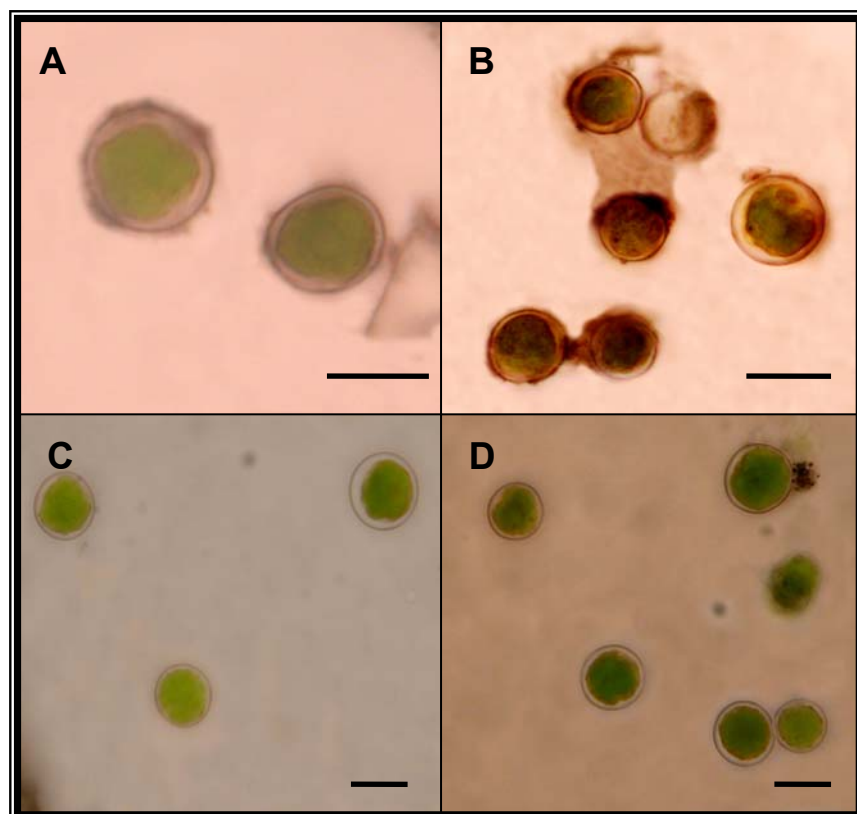


Figura 31. Detección del ligando (ureasa) para la lectina fúngica en la pared celular de clorobiontes de *Evernia* como depósitos negros de CoS. (A) Control sin urea y (B) reacción con urea de algas aisladas de líquenes recolectados en Noviembre. (C) Control sin urea y (D) algas incubadas en urea de talos recolectados en Mayo. Bar = 5.0 μm .

Los clorobiontes de las muestras recolectadas en primavera aparecían verdes y redondeados, con pared celular clara y bien diferenciada en el caso de los controles, debido a la ausencia de receptor (**Fig. 31C**). Sin embargo, la preincubación con urea produjo una plasmolisis incipiente de las células y la aparición de depósitos negros en la pared, formados por CoS tras la detección citoquímica.

2. LOS MÁXIMOS DE ACTIVIDAD DE ARGINASA Y UREASA NO COINCIDEN DURANTE EL AÑO

Las actividades arginasa y ureasa se midieron a lo largo de todo un año en talos de *E. prunastri* recogidos en el campo durante la tercera semana de cada mes (**Fig. 32**).

Para la valoración de ambas actividades enzimáticas, los talos fueron incubados en medios tamponados conteniendo sus respectivos sustratos, L-arginina para la arginasa y urea para la ureasa. Los medios de incubación se filtraron y dializaron, tras lo cual se midieron ambas actividades tal y como se explica en los apartados 4.2 y 5.4 de Material y Métodos.

La actividad arginasa más alta fue obtenida para los talos recogidos durante el mes de Julio, pero también se observaron otros dos máximos secundarios, el primero durante Abril y Mayo, y el segundo de Septiembre a Noviembre (**Fig. 32A**). Sin embargo, la secreción de ureasa por parte de los talos comenzó en Septiembre-Octubre y tomó valores mínimos una vez pasado el invierno (**Fig. 32B**).

Dado que tanto la arginasa como la ureasa son proteínas inducibles, esto implica que los picos de máxima actividad deben ser una respuesta fisiológica a los contenidos más altos de arginina (para inducir arginasa) y de urea (para inducir la ureasa) en el talo, en ausencia de los mismos como inductores nutricionales exógenamente suplementados.

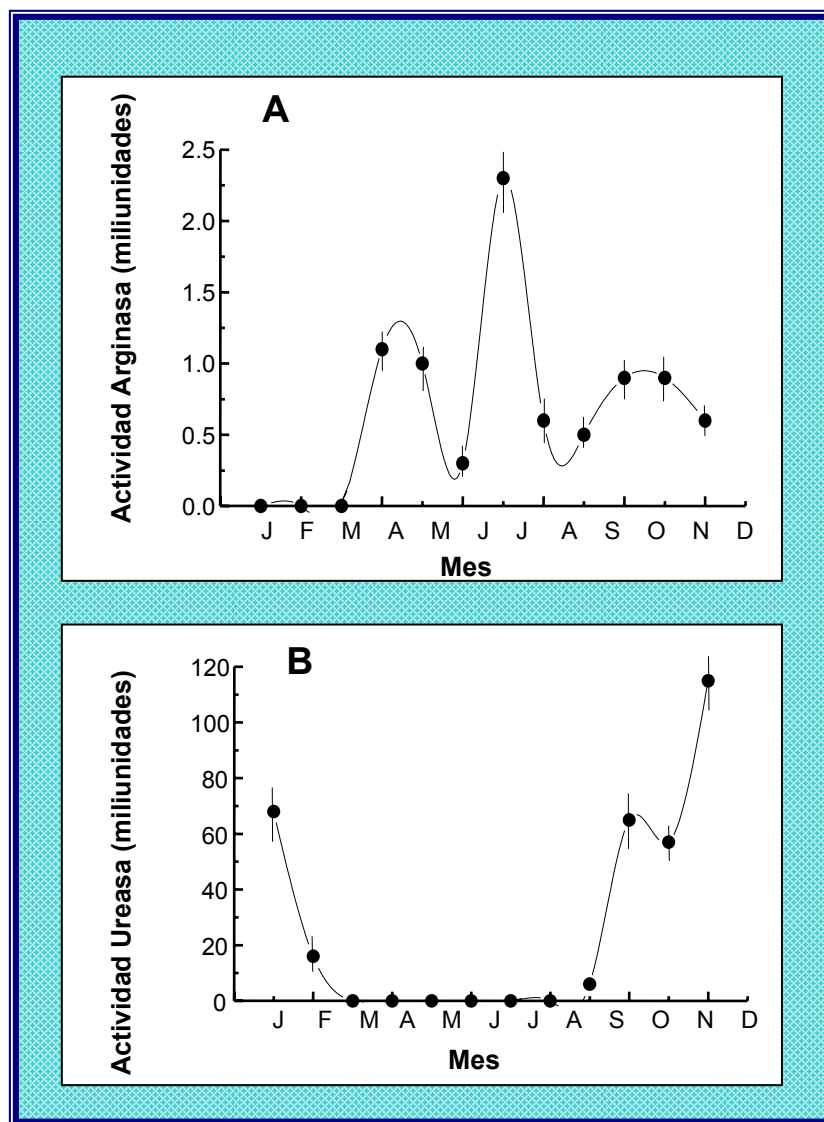


Figura 32. Secreción de Arginasa (A) y Ureasa (B) a lo largo del año a partir de talos incubados en tampón medida como actividad específica enzimática (unidad= $1 \mu\text{mol NH}_4^+/\text{mg prot min}$). Los valores corresponden a la media de tres réplicas. Los errores estándar vienen representados por barras verticales.

3. LAS BAJAS TEMPERATURAS Y LOS DÍAS CORTOS PRODUCEN LA APARICIÓN DE APLANOSPORANGIOS Y CÉLULAS JÓVENES DENTRO DEL TALO DE *E. prunastri*

Dado que el sistema de reconocimiento celular descrito no sólo debe ser válido para reconocer células compatibles de vida libre, sino aquellas células recién nacidas que se produzcan dentro del talo por mitosis de los fotobiontes, secciones de los talos mantenidos bajo distintas condiciones de fotoperiodo y temperatura fueron observadas por microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

3.1. Efectos del fotoperiodo

En las muestras de líquenes mantenidos bajo condiciones de día largo (16 h en luz y 8 h en oscuridad) no se observaron aplanosporangios (**Fig. 33A y B**), mientras que estos fueron claramente detectados en las secciones de los talos que permanecieron bajo un fotoperiodo de día corto (**Fig. 33C y D**), aunque la aparición de estas células no fue constante (**Fig. 33E y F**).

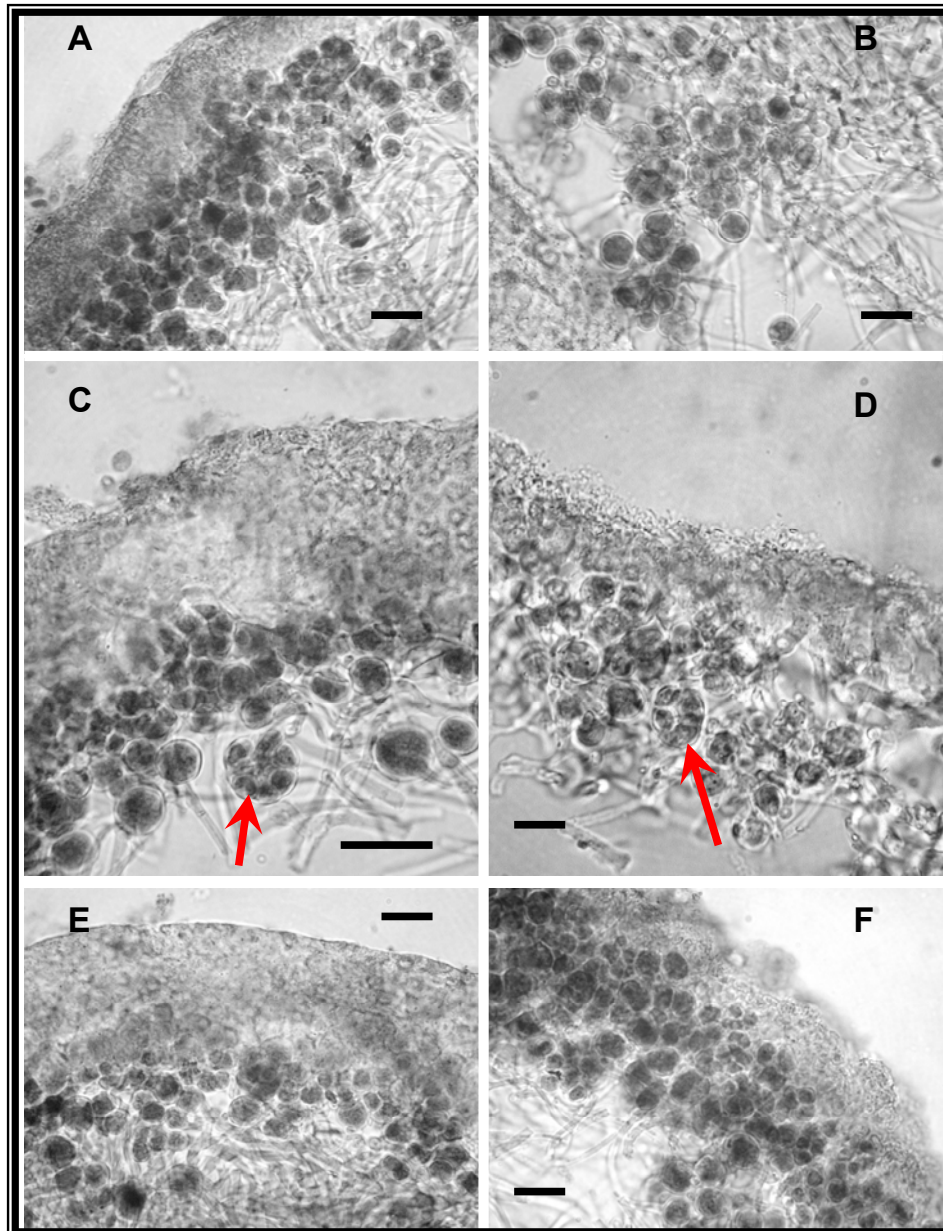


Figura 33. Efectos de las condiciones fotoperiódicas sobre el tamaño de las algas visualizados en cortes histológicos de 8 μm de espesor por microscopía de campo claro. (A) y (B) Células control bajo 16 h de luz y 8 h de oscuridad. (C - F) Secciones de talos bajo 8 h de luz y 16 h de oscuridad. Las flechas indican aplanosporangios. Barras= 10 μm .

Por otro lado, el estudio de la distribución de las células según su tamaño indicaba que la frecuencia de células maduras (área $> 21,4 \mu\text{m}^2$) en el talo era siempre la más alta cuando las condiciones de fotoperiodo eran de día largo (**Fig. 34A**), mientras que las células de menor tamaño (área comprendida entre $4,3 \mu\text{m}^2$ y $7,1 \mu\text{m}^2$) eran abundantes en los talos de líquenes mantenidos bajo condiciones de día corto (**Fig. 34B**).

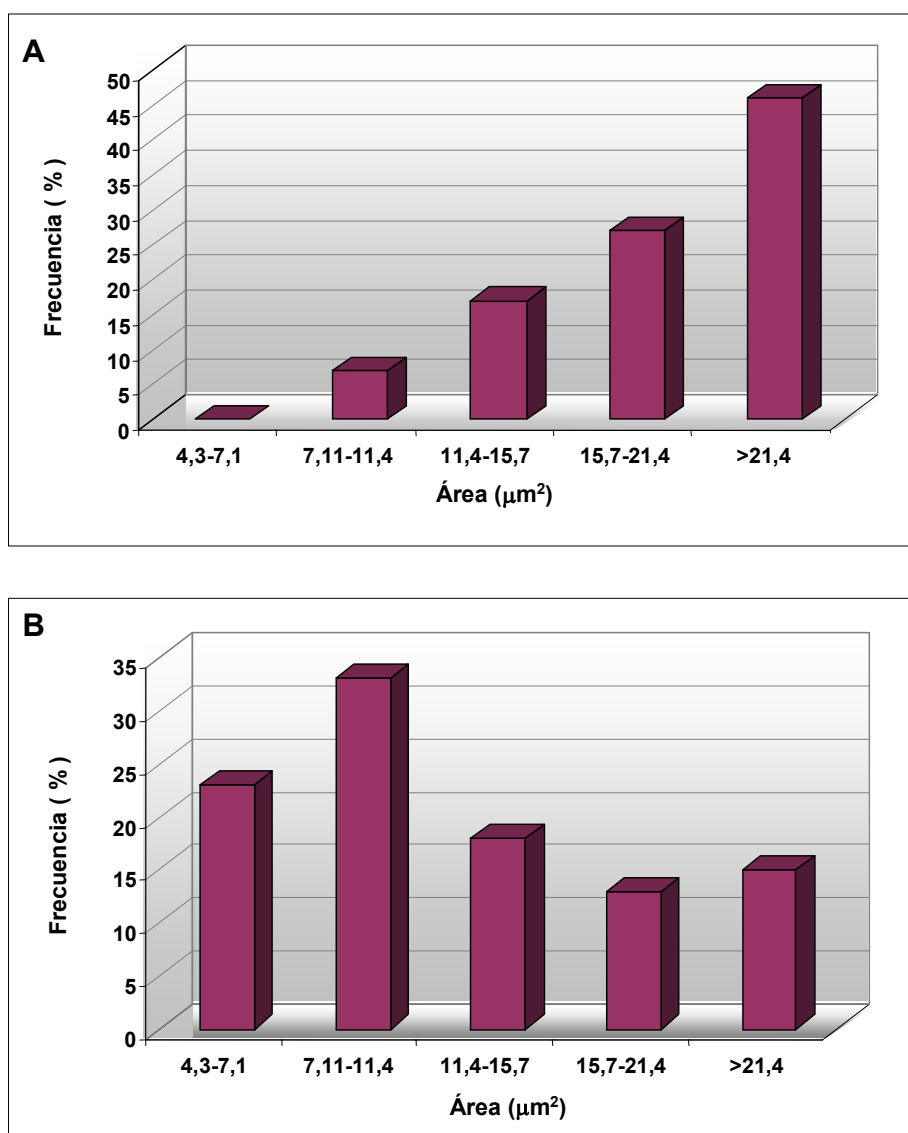


Figura 34. Efecto de las condiciones fotoperiódicas sobre la frecuencia de distribución del tamaño en las células. (A) Frecuencia del tamaño de algas de talos sometidos a condiciones de día largo (16 h de luz, 8 h de oscuridad). Los valores son la media de 160 células de seis talos diferentes. (B) Frecuencia del tamaño de clorobiontes de talos bajo condiciones de día corto (8h de luz, 16 h de oscuridad). Los valores son la media de 140 células aisladas de 5 talos diferentes. El error estándar nunca fue superior al 10 %.

3.2. Efectos de la temperatura

El efecto de la temperatura mostró resultados similares a los encontrados para el fotoperiodo. No se encontraron aplanosporangios en aquellas secciones de talos mantenidos a temperatura ambiente (**Fig. 35A y B**). Sin embargo, en las muestras sometidas a bajas temperaturas durante tres días se observaron aplanosporangios y células en división activa (**Fig. 35C y D**).

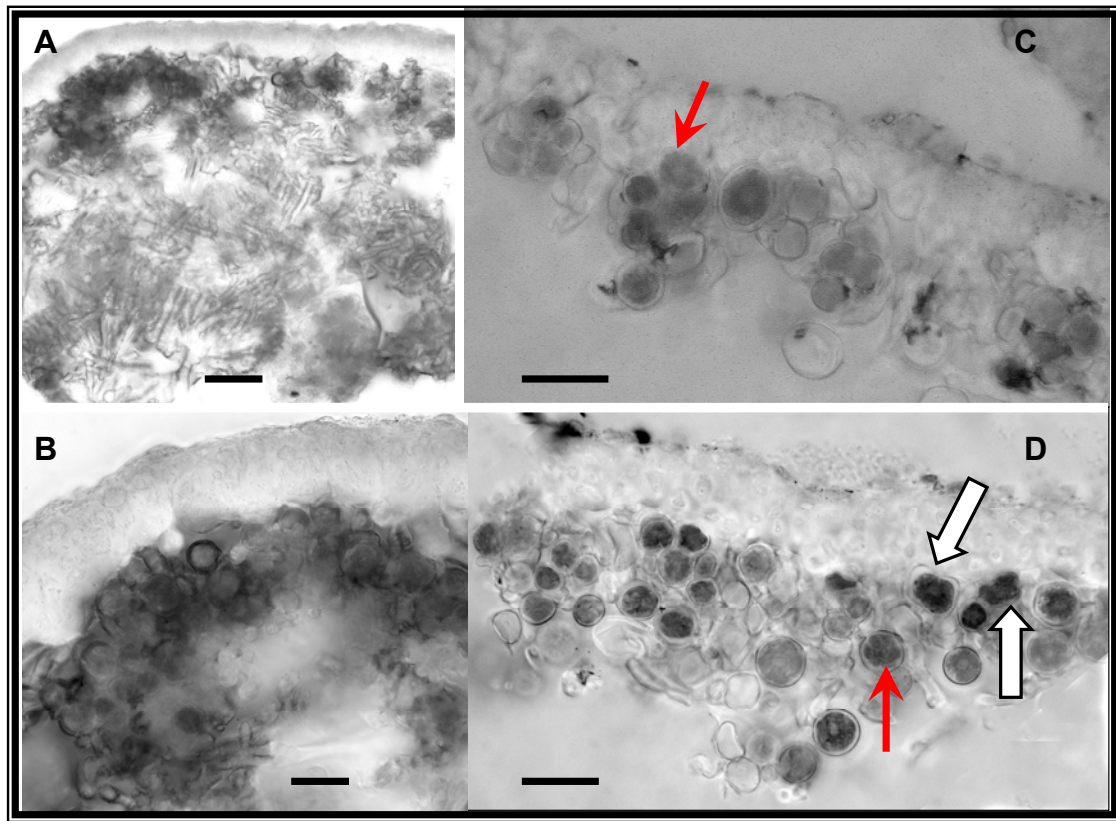


Figura 35. Efecto de la temperatura sobre la frecuencia de la distribución celular según su tamaño visualizado bajo un invertomicroscopio en cortes histológicos de 8 μm de espesor. (A) y (B) Muestras almacenadas a temperatura ambiente. (C) y (D) Talos sometidos a bajas temperaturas, 24 h a $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 48 h a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las flechas rojas señalan aplanosporangios y las blancas indican células iniciando división. Barras = 20 μm en (A) y 10 μm desde (B) a (D).

En cuanto a la distribución de las células por el tamaño (**Fig. 36**), las condiciones de frío produjeron una frecuencia alta de células de mediano tamaño (entre $7,1\text{ }\mu\text{m}^2$ y $21,4\text{ }\mu\text{m}^2$) a costa de un descenso en el número de las más grandes (**Fig. 36B**). Esto implicaba que las bajas temperaturas inducían la división celular en aquellas células cuyo área fuera mayor que $21,4\text{ }\mu\text{m}^2$.

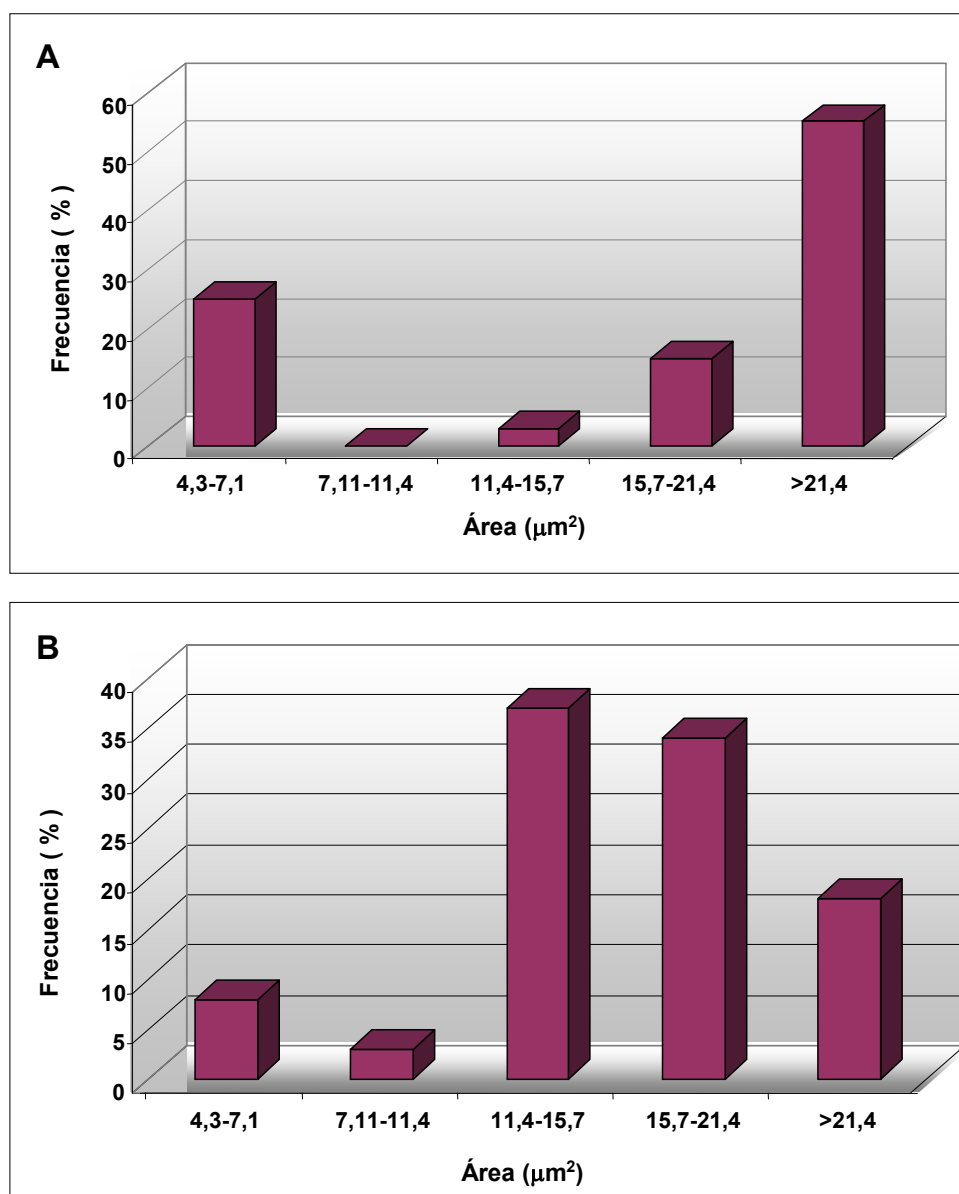


Figura 36. Efecto de la temperatura sobre la frecuencia de distribución de las células según su tamaño. (A) Frecuencia del tamaño celular de talos almacenados a temperatura ambiente. Los valores son la media de 122 células de 5 talos diferentes. (B) Frecuencia del tamaño de algas procedentes de talos mantenidos a 5 °C durante 24 h y a -6 °C durante 48 h. Los valores son la media de 165 algas de 6 talos diferentes. El error estándar nunca superó el 10 %.

Dado que las bajas temperaturas podían producir cambios tanto ultraestructurales como fisiológicos en el talo liquénico, las mismas muestras fueron analizadas por TEM. Las muestras almacenadas a temperatura ambiente presentaban las hifas en contacto con las algas mediante adhesión “pared con pared” (Fig. 37A) aunque en algunos casos se observaban haustorios intraparietales (Fig. 37B), no así intracelulares. Los aplanosporangios, conteniendo de 4 a 5 aplanosporas, se encontraron en una frecuencia muy baja (Fig. 37C).

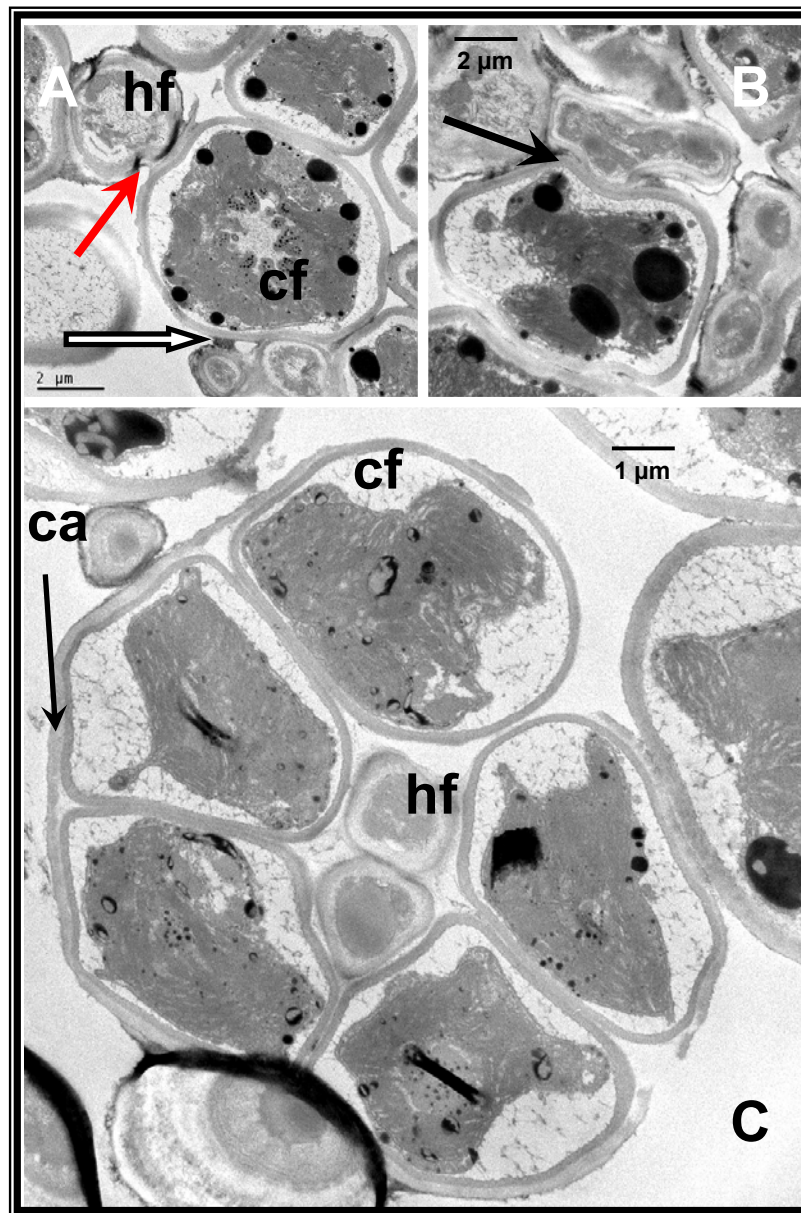


Figura 37. Microscopía Electrónica de Transmisión de talos de *E. prunastri* bajo temperatura ambiente. (A) Dos zonas de contacto diferentes entre el alga y el hongo, adhesión “pared con pared” (flecha roja), y puentes de mucílago (flecha blanca). (B) Haustorio intraparietal. (C) Uno de los pocos aplanosporangios observados en condiciones de temperatura ambiente. Hf = hifa fúngica; cf = célula del clorobionte; ca = cubierta del aplanosporangio.

Estas dos formas de contacto (adhesión “pared con pared” y los haustorios intraparietales) se encontraron también en las secciones de los talos sometidos a bajas temperaturas, e incluso dentro de los aplanosporangios (**Fig. 38A y B**), pero la frecuencia de la formación de aplanosporas fue mayor que en la obtenida en los talos mantenidos a temperatura ambiente. La división de aplanosporas dentro de los aplanosporangios se pudo observar muy frecuentemente (**Fig. 38C y D**).

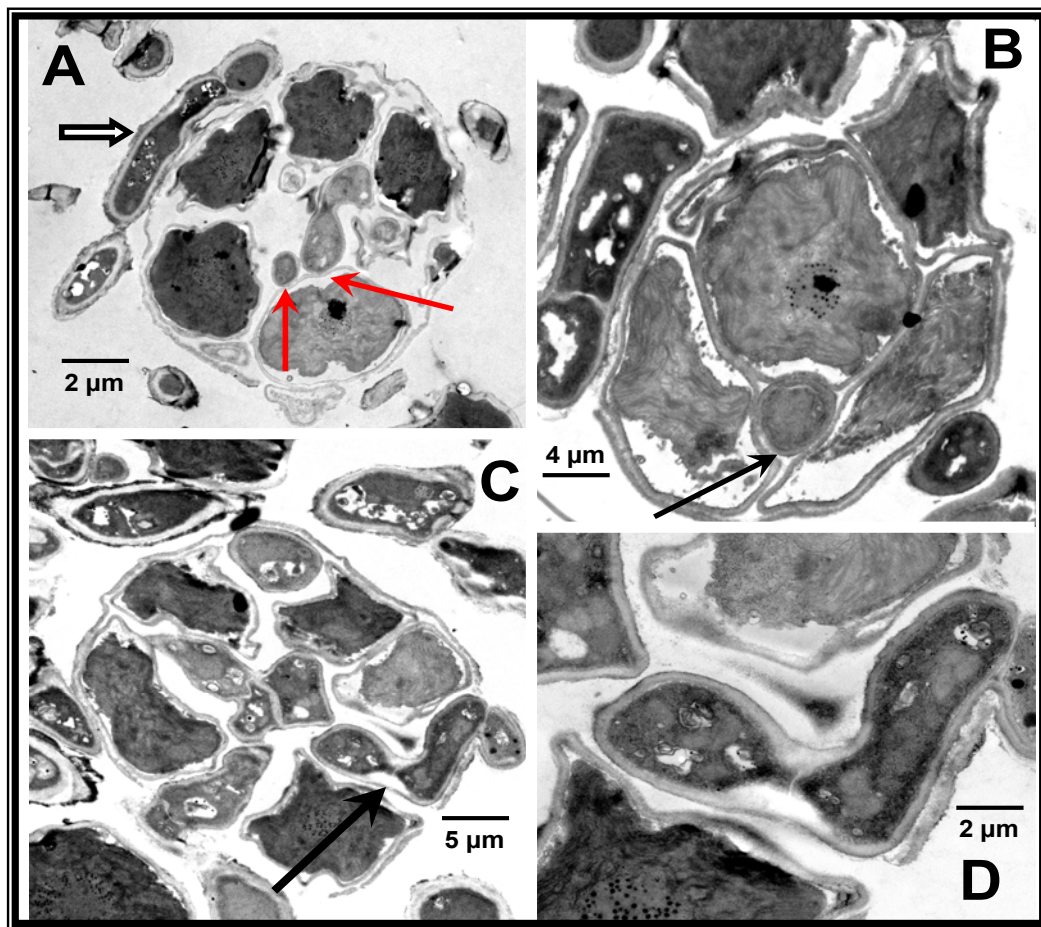


Figura 38. Microscopía Electrónica de Transmisión de talos de *E. prunastri* sometidos a bajas temperaturas. (A) Aplanosporangio conteniendo cinco aplanosporas en el que algunas hifas contactan con las algas mediante adhesión “pared con pared” (flechas rojas). Las hifas externas contactan con la superficie de la cubierta del aplanosporangio también mediante adhesión “pared con pared” (flecha blanca). (B) A veces, los haustorios intraparietales pueden ser vistos dentro del aplanosporangio (flecha negra). (C) y (D) Aplanosporas dividiéndose dentro del aplanosporangio.

4. LIGAMIENTO DE LA LECTINA A LA PARED DE LOS CLOROBIONTES

4.1. Valoración de la actividad enzimática arginasa

Las algas aisladas de talos de *E. prunastri* recolectados en Noviembre, portadoras del receptor (véase curva de secreción anual de la ureasa, **Fig. 32B**) sin ser sometidas a ningún tratamiento en su pared celular, y después incubadas con la arginasa inducida, obtenida a partir de los talos en medio tamponado con arginina, mostraron ligamiento de la enzima en un 85 %, mientras que solamente se recuperó un 13,3 % del total de actividad enzimática en los sobrenadantes después de la incubación (**Fig. 39A**). Por tanto, parece existir un estricto paralelismo entre cantidad de arginasa no retenida sobre la pared celular (15%) y actividad enzimática recuperada en la fracción no ligada (13,3%).

Sin embargo, la cantidad de arginasa unida a las células disminuyó drásticamente cuando los clorobiontes se trataron previamente con la enzima α -1,4-galactosidasa antes de la adición de la lectina, mostrando un 67 % del total de la actividad en el sobrenadante (solamente un 33% de la lectina habría sido retenida sobre las paredes de las algas). Por otro lado, el pretratamiento de las células con la enzima β -1,4-galactosidasa permitió un ligamiento de arginasa a las células similar al encontrado para el grupo control (**Fig. 39A**).

En el caso de las algas aisladas de talos de *Evernia* recogidos en primavera (**Fig. 39B**), previamente incubados en urea para inducir el ligando, las células control, sin tratamiento con galactosidasas, retuvieron aproximadamente la mitad del total de arginasa añadida al medio de incubación. La acción de la enzima α -1,4-galactosidasa anuló completamente la adhesión de la arginasa a las algas. Por el contrario, la incubación con β -1,4-galactosidasa permitió la unión de la lectina a las células en un 73 %.

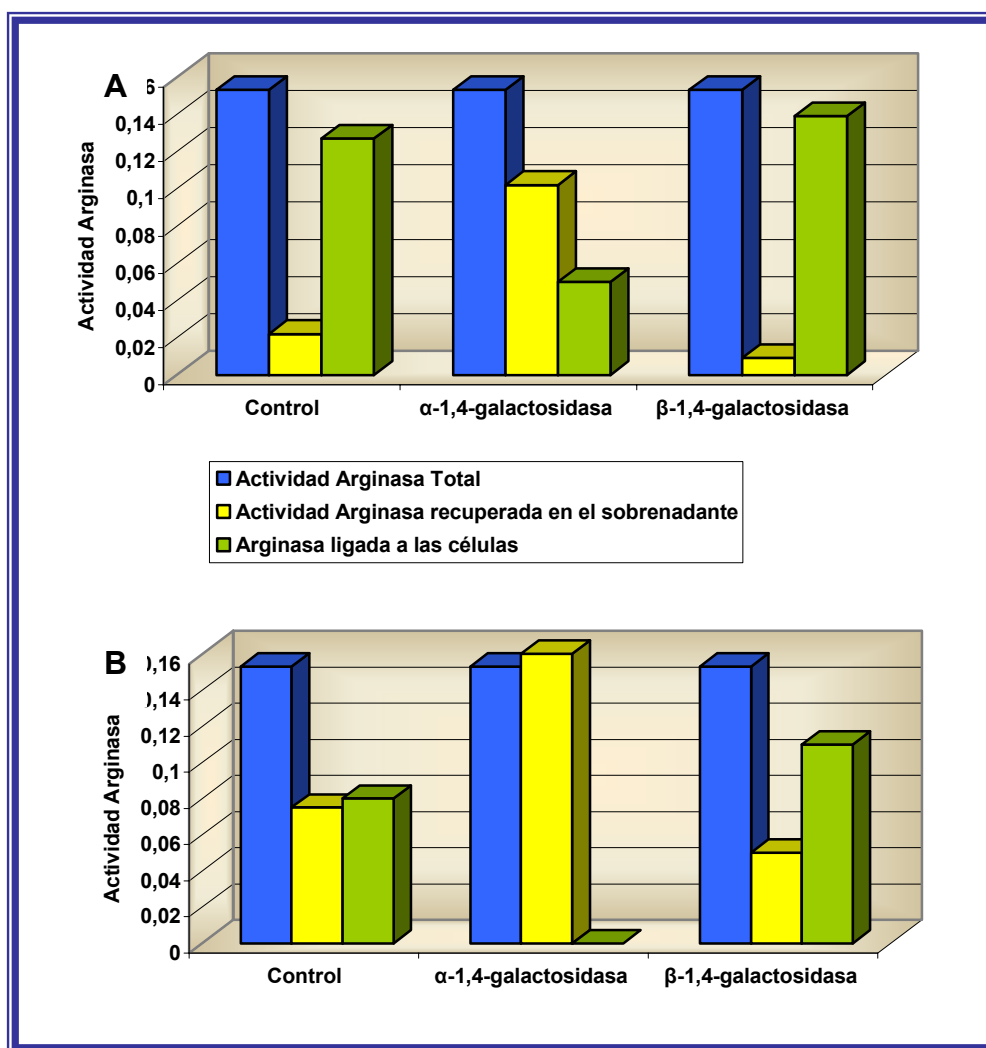


Figura 39. Actividad arginasa después de la unión de la enzima al ligando de pared celular de clorobiontes incubados con distintas enzimas. (A) Unión a células que contienen el ligando de manera natural, talos recogidos en Noviembre. (B) Unión a células en las que se ha inducido el ligando experimentalmente mediante incubación con urea, talos recogidos en Mayo. Los valores son la media de tres réplicas. El error estándar nunca fue superior al 10 %.

4.1.1. Valoración de azúcares liberados por la acción de las galactosidasas sobre la pared celular de los clorobiontes

Los tratamientos de las algas con las enzimas α -1,4 y β -1,4-galactosidasa se realizaron con el objeto de hidrolizar el resto polisacárido del receptor de pared, ureasa poligalactosilada, en orden a modificar su actividad como ligando. Después de la acción de dichas enzimas, se debería producir la correspondiente liberación de azúcares al medio.

Dichos azúcares fueron estimados mediante el método de Dubois y colaboradores, (1956) en el que los azúcares reaccionan con ácido sulfúrico en presencia de fenol (**Tabla IV**).

Tabla IV. Medida de la cantidad de azúcares totales liberados al medio por clorobiontes de *Evernia* en dos estados fisiológicos distintos (con o sin receptor de pared) tratados con α - y β -galactosidasa. Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar.

Clorobiontes Aislados de	Tratamiento Enzimático	Azúcares ($\mu\text{g mL}^{-1}$ de la suspensión de algas)
Talos con ligando inducido naturalmente	Sin Tratamiento	256,5 \pm 22,8
	α -1,4-galactosidasa	329,3 \pm 28,2
	β -1,4-galactosidasa	289,8 \pm 24,9
Talos sin ligando, pero experimentalmente inducido con urea	Sin Tratamiento	226,6 \pm 19,4
	α -1,4-galactosidasa	330,6 \pm 28,4
	β -1,4-galactosidasa	260,8 \pm 22,7

La cantidad de azúcares liberados por las enzimas fue mayor para los líquenes recogidos en otoño que para los recogidos en primavera, en los cuales se indujo el receptor experimentalmente mediante incubación previa con urea. La α -1,4-galactosidasa llevó a cabo una hidrólisis más activa de los polisacáridos de pared que la β -1,4-galactosidasa en ambas clases de talos.

4.1.2. Valoración de galactosa

Asimismo, se determinó la liberación de galactosa mediante la oxidación específica de la hexosa con la galactosa oxidasa (D-galactosa : oxígeno 6-oxido-reductasa). Como se muestra en la **Tabla V**, la cantidad más alta de galactosa fue liberada por las algas que tenían el receptor inducido de manera natural (líquenes recolectados en otoño) y, además, el tratamiento con la α -1,4-galactosidasa siempre liberaba una cantidad de galactosa mayor que aquella producida por la acción de la β -1,4-galactosidasa.

Tabla V. Medida de la cantidad de galactosa liberada al medio por clorobiontes de *Evernia* en dos estados fisiológicos distintos (con o sin receptor de pared) tratados con α - y β -galactosidasa. Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar.

Clorobiontes Aislados de	Tratamiento Enzimático	Galactosa ($\mu\text{g mL}^{-1}$ de la suspensión de algas)
Talos con ligando inducido naturalmente	Sin Tratamiento	129,6 \pm 9,7
	α -1,4-galactosidasa	205,2 \pm 17,6
	β -1,4-galactosidasa	64,8 \pm 5,8
Talos sin ligando, pero experimentalmente inducido con urea	Sin Tratamiento	57,6 \pm 5,3
	α -1,4-galactosidasa	90,0 \pm 7,9
	β -1,4-galactosidasa	61,2 \pm 5,4

4.2. Unión de la lectina marcada con ITCF a los clorobiontes

4.2.1. Fluorimetría

La medida de la emisión de fluorescencia después de desorber con galactosa 100 mM la arginasa marcada adherida a las células, usando células no incubadas con las galactosidasas y aisladas de líquenes recolectados en Noviembre, indicaba que una parte significativa de la arginasa fluorescente estaba superficialmente unida a la pared del alga (**Fig. 40**). Aproximadamente, un 50 % de la arginasa marcada, añadida a células sin tratar, fue retenida sobre la pared celular y desorbida prácticamente en su totalidad por la galactosa.

Sin embargo, solamente un 20 % del total de la arginasa marcada puesta en contacto con las células incubadas con la enzima α -galactosidasa fue retenido en las paredes celulares, de la cual un 6 % pudo desorberse con galactosa y el resto fue recuperado tras romper las células mecánicamente con alúmina y sonicación posterior. Para los casos en los que se trataron las células con β -galactosidasa, los resultados fueron similares a aquellos encontrados para el grupo control.

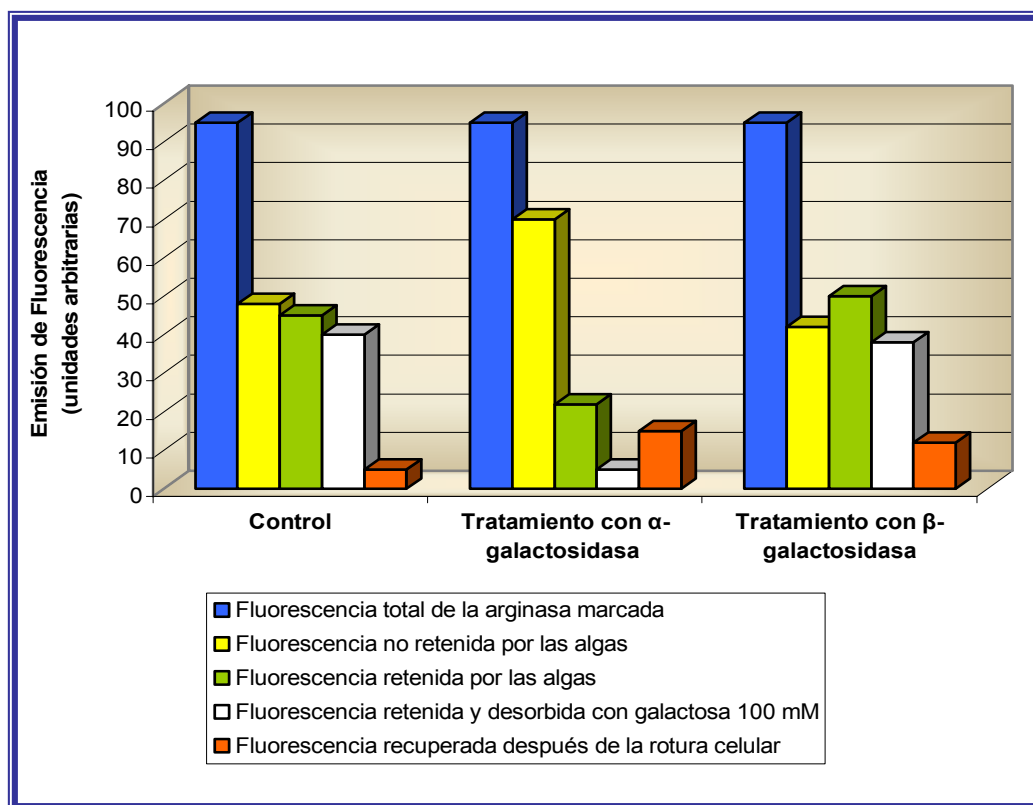


Figura 40. Medida de la emisión de fluorescencia de la arginasa segregable de *E. prunastri* marcada con ITCF e incubada después con clorobiontes, aislados de talos con receptor de pared naturalmente inducido, sometidos a distintas pruebas experimentales.

4.2.2. Microscopía de Fluorescencia

La arginasa segregada por los talos de *Evernia* fue marcada con ITCF y después utilizada en los siguientes ensayos de ligamiento. La lectina fue incubada con algas aisladas de líquenes recogidos en otoño y primavera, inducido el receptor de pared con urea en estos últimos, para después ser observadas por Microscopía de Fluorescencia. De igual modo, se reservó una parte de las células para ponerlas en contacto con ambas galactosidasas. En las siguientes micrografías se muestran los resultados del ligamiento.

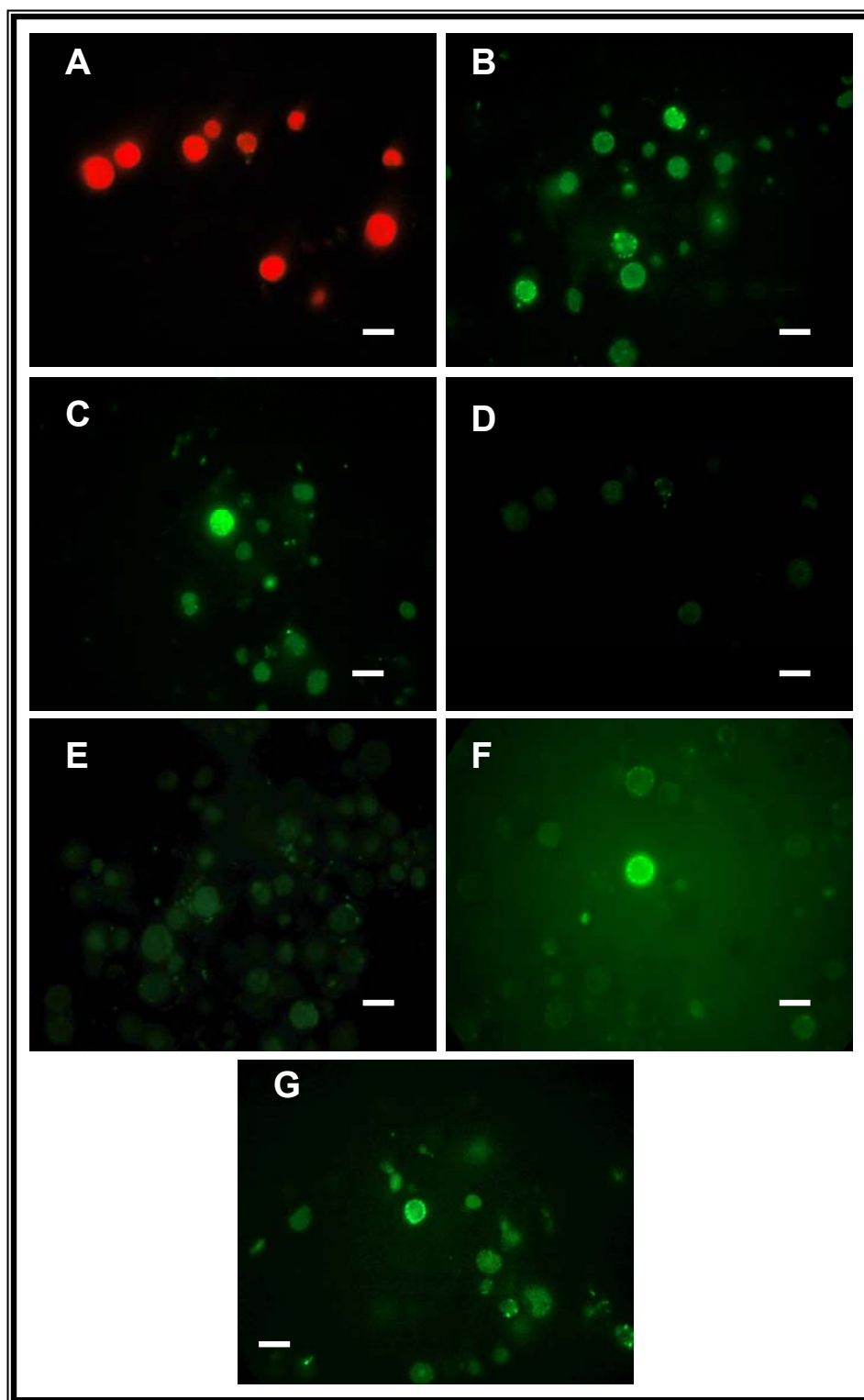


Figura 41. Unión de la lectina marcada con ITCF a clorobiontes observados bajo irradiación con luz azul. (A) Control sin incubación con la arginasa marcada. (B) Clorobiontes de talos recolectados en Noviembre tratados con arginasa marcada. (C) Clorobiontes de talos recogidos en Mayo, incubados previamente en urea y tratados con arginasa marcada. (D) Las mismas células que en B tratadas con α -galactosidasa e incubadas después con arginasa marcada. (E) Las mismas células que en C tratadas con α -galactosidasa e incubadas después con arginasa marcada. (F) Las mismas células que en B tratadas con β -galactosidasa e incubadas después con arginasa marcada. (G) Las mismas células que en C tratadas con β -galactosidasa e incubadas después con arginasa marcada. Barras= 5,0 μ m.

Las células control, las cuales no fueron sometidas a ningún tratamiento ni incubadas con la arginasa fluorescente, no mostraron emisión de fluorescencia desde sus paredes celulares; solamente emitieron fluorescencia roja debida a las clorofilas foto-excitadas (**Fig. 41A**). Cuando las algas fueron incubadas con arginasa marcada con ITCF, se observaron pequeños pero numerosos puntos de intensa fluorescencia verde en las paredes celulares (**Fig. 41B y C**), para ambos estados fisiológicos del liquen.

En cambio, en el caso de las algas tratadas con la enzima α -galactosidasa y después puestas en contacto con la arginasa fluorescente, no se observó emisión de fluorescencia en ningún caso, ni en algas aisladas de talos recogidos en otoño (**Fig. 41D**), ni en algas aisladas de talos recogidos en primavera e incubados previamente en urea para inducir experimentalmente la ureasa de pared (**Fig. 41E**). Sin embargo, la acción de la enzima β -galactosidasa sobre la pared celular no disminuyó significativamente la unión de la arginasa fluorescente a su ligando de pared, ya que las algas mostraron emisión de fluorescencia bajo la irradiación de luz azul (**Fig. 41F y G**).

5. VALORACIÓN DE ARGINASA EN *L. corniculatum*

La actividad enzimática arginasa en el cianoliquen *L. corniculatum* fue valorada para estimar tanto la secreción al medio como la producción en el talo (**Fig. 42**). Para ello muestras de 0,5 g de peso seco de talo liquénico se incubaron en 10 mL de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15 conteniendo o no L-arginina 40 mM, durante 4 min, 2, 4, 6 y 8 h a 25° C en oscuridad.

Tanto la producción como la secreción de arginasa fueron mayores para los talos sumergidos en tampón con arginina que en tampón en ausencia del aminoácido. El máximo de producción (**Fig. 42B**) se alcanzó a las 2 h de incubación para disminuir y estabilizarse a partir de las 4h, mientras que el máximo de secreción (**Fig. 42A**) fue obtenido a los 4 min de incubación para decaer también a las 4h.

Este descenso llegó a valores muy bajos, incluso llegó a anularse la secreción de arginasa hasta que a las 6 h se recuperó la secreción activa en talos en contacto con la arginina.

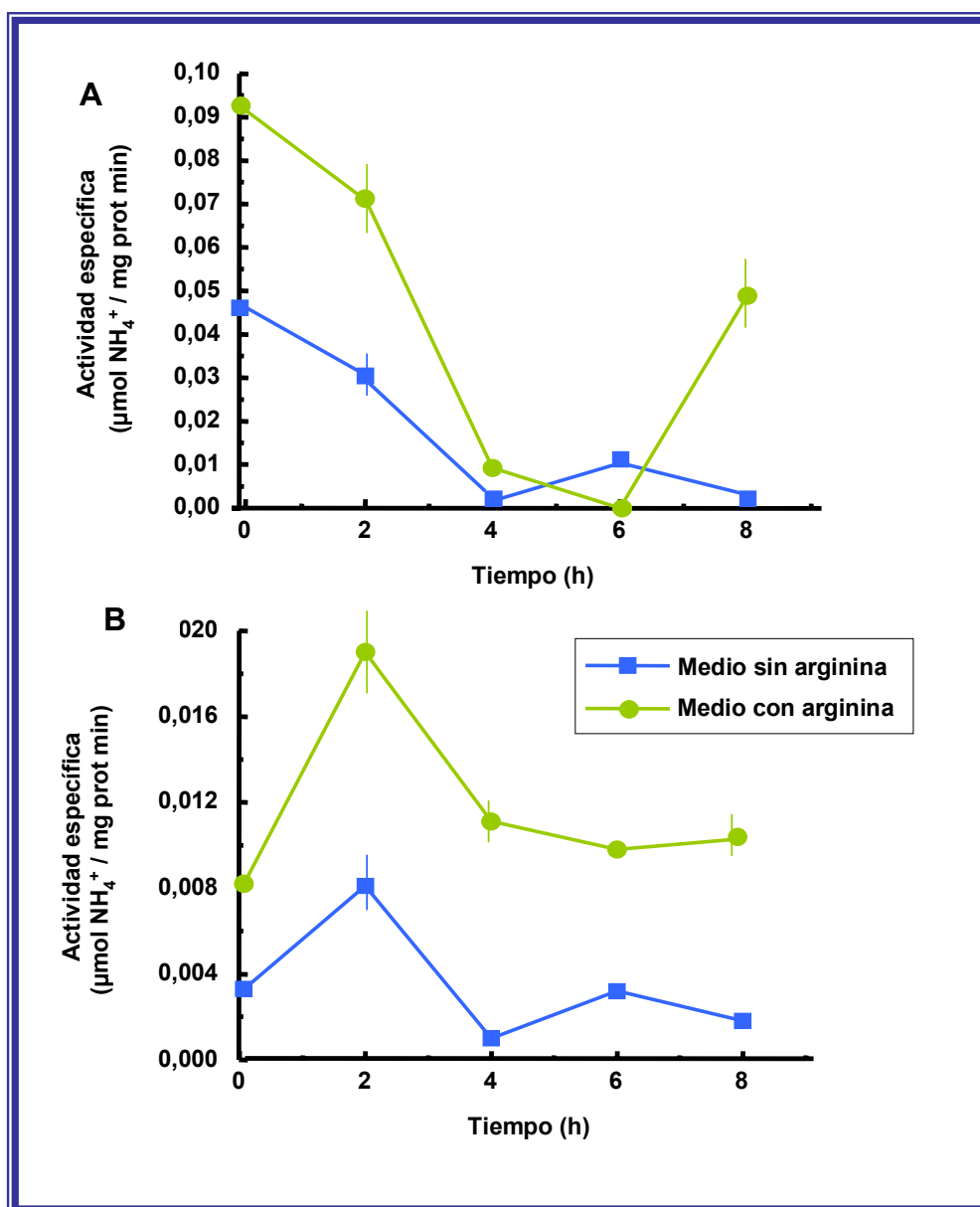


Figura 42. Valoración de la actividad específica de arginasa segregable (A) e intratalina (B) en talos de *L. corniculatum* previamente incubados en tampón solamente (azul), o en tampón conteniendo arginina (verde) frente al tiempo. Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar.

6. LA ARGINASA SEGREGABLE DE *L. corniculatum* RECONOCE LA UREASA POLIGALACTOSILADA COMO LIGANDO

6.1. Cromatografía de afinidad

La ureasa de *Evernia*, obtenida según se describe en el apartado 4.1. del apartado Material y Métodos, se unió sobre agarosa activada con bromuro de cianógeno. Tras ello, los medios procedentes de la incubación de *Leptogium* durante 2 h en tampón Tris HCl 10 mM, pH 9,15, con L-arginina 40 mM, se hicieron pasar por lechos de ureasa-agarosa. De la elución de las columnas con tampón Tris-HCl 10 mM a pH 9,15 se obtuvieron fracciones de 3 mL, en las que se cuantificaron la cantidad de proteínas totales (**Fig. 43A**) y la actividad arginasa (**Fig. 43B**).

La cantidad de proteína total eluida solo con tampón (fracciones 1-17) fue de 3,0 mg mientras que, al añadir galactosa, se eluyeron 4,0 mg de proteína total. Cuando se realizó la elución de un lecho distinto con el mismo tampón pero conteniendo galactosa después de la elución con tampón solo (fracciones 18-34), se recuperaron 6,1 mg de proteína total y cuando se eluyó con tampón conteniendo manosa (fracciones 35-49), fueron 4,5 mg de proteína recuperada. La actividad arginasa fue recuperada únicamente en las fracciones eluidas con tampón conteniendo galactosa, encontrándose tres picos de actividad, correspondientes a las fracciones 5, 7 y 11, y otro mayor en la fracción 17.

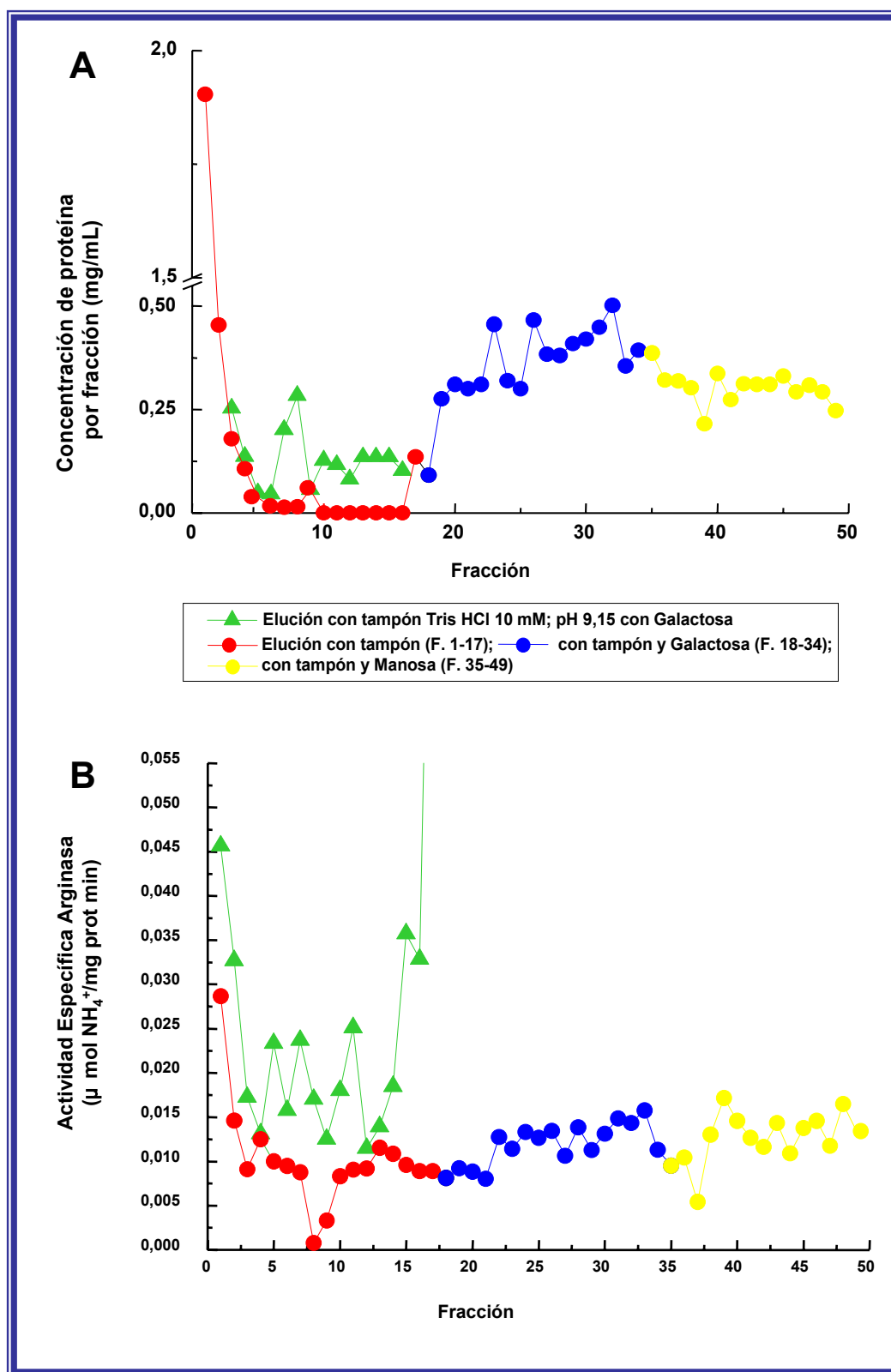


Figura 43. Valoración de la concentración de proteína (A) y de la actividad arginasa (B) en las fracciones de elución de la arginasa de *L. corniculatum* sobre lechos de agarosa activada con bromuro de cianógeno con ureasa de *E. prunastri* adsorbida.

6.2. Separación de proteínas eluidas por cromatografía de afinidad mediante PAGE-SDS

Las fracciones 4, 5 7 y 11 de ambos procesos de separación, así como el medio de incubación del talo de *Leptogium* en tampón sin pasar por la columna de afinidad, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (**Fig. 44**).

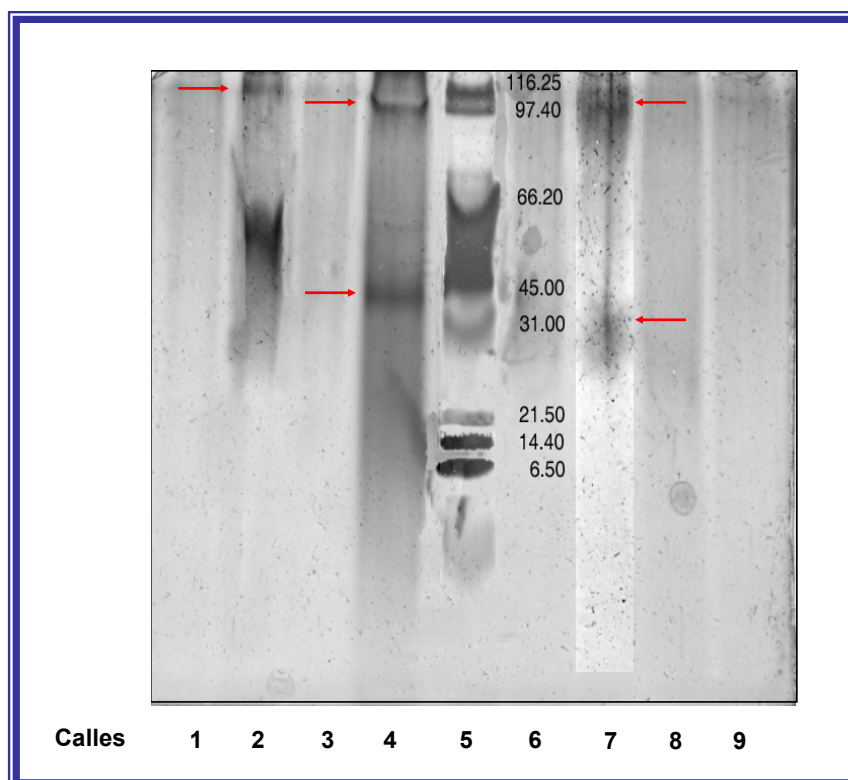


Figura 44. Gel de la electroforesis en poliacrilamida-SDS de las fracciones de la cromatografía de afinidad. Calle 1: Fracción 5 de la columna eluida con tampón con Galactosa. Calle 2: Fracción 4 eluida con tampón. Calle 3: Fracción 4 eluida con tampón- Galactosa. Calle 4: Medio de incubación de *Leptogium* sin pasar por columna. Calle 5: Marcadores Moleculares (kDa). Calle 6: Fracción 11 eluida con tampón. Calle 7: Fracción 11 eluida con tampón - Galactosa. Calle 8: Fracción 7 eluida con tampón. Calle 9: Fracción 7 eluida con tampón-Galactosa.

En este último medio (calle 4) y en la fracción 11 perteneciente a la elución con galactosa 50 mM (calle 7) se reveló una banda con una movilidad electroforética similar a aquella descrita para la arginasa segregable de *Evernia* con una masa molecular de 33,7 kDa y 31 kDa, respectivamente. Las masas moleculares se estimaron utilizando la recta de regresión $y = 1,80x + 0,42$ ($r^2 = 0,96$), obtenida a partir de las masas moleculares de los patrones (**Fig. 45**).

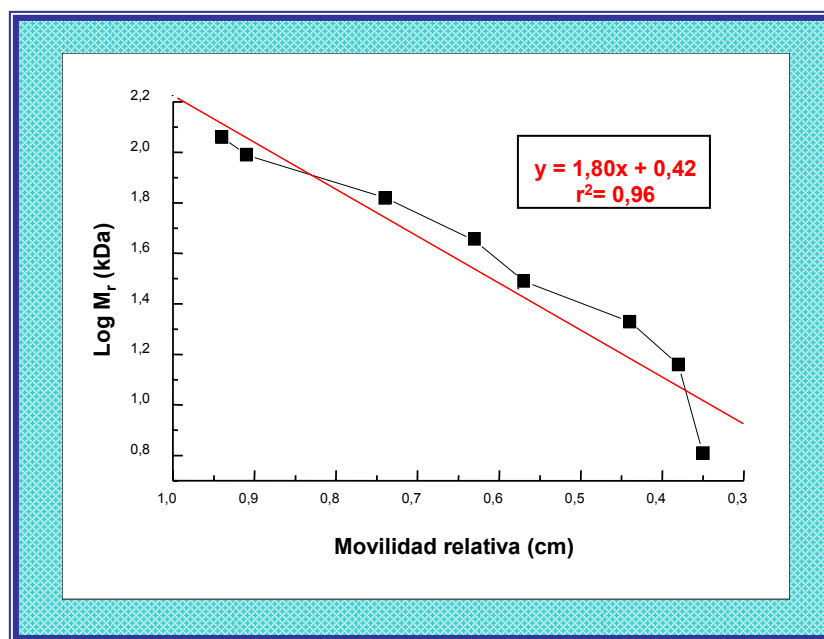


Figura 45. Representación gráfica del logaritmo de las masas moleculares de los patrones de proteínas utilizados en la PAGE-SDS, frente a la movilidad electroforética de las mismas en cm y ajuste de los puntos por regresión lineal.

Ambas bandas desarrollaron actividad arginasa cuando la proteína fue eluida de los geles teñidos azul coloidal Coomassie, cortando la banda y sumergiéndola en tampón durante un tiempo suficiente, mayor valor de actividad en aquella de la calle 7 (proteína purificada por cromatografía de afinidad) que para la de la calle 4 (proteína directamente segregada al medio de incubación), aunque esta actividad no pudo medirse para los geles con tinción de sales de plata probablemente por la inhibición de la arginasa por el metal.

7. LA ARGINASA SEGREGABLE DE *L. corniculatum* RECONOCE CIANOBIONTES DE *Leptogium* ASÍ COMO A CLOROBIONTES DE *Evernia*

La arginasa segregable de *L. corniculatum* se marcó con ITCF y se puso en contacto con los cianobiontes recién aislados de la misma especie de líquen durante 1 h. Las células de *Nostoc* sin incubar con la arginasa marcada mostraron autofluorescencia roja debido a las clorofilas fotoexcitadas, incluso cuando estaban todavía dentro del talo (Fig. 46A).

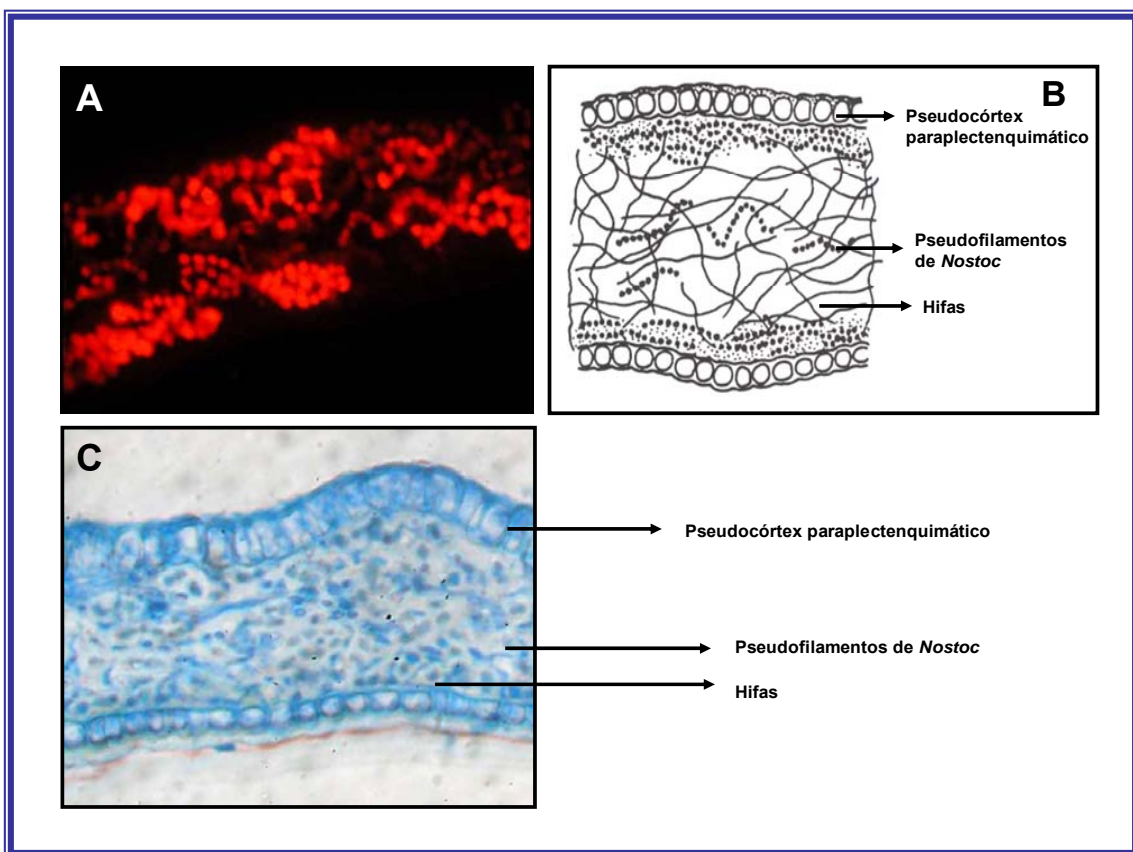


Figura 46. Talo de *Leptogium corniculatum* al microscopio óptico de campo claro y fluorescencia. (A) Sección transversal del talo de *Leptogium corniculatum* bajo luz azul mostrando la autofluorescencia roja de las clorofilas fotoexcitadas de células de *Nostoc* formando pseudofilamentos pero nunca heterocistos. (B) Esquema del talo de un cianolíquen (*Euloleptogium*). (C) Sección transversal del talo homómero de *Leptogium* realizada con un microtomo de congelación y teñido con lactofenol azul de algodón.

El mismo corte transversal, de 10 μm de espesor, obtenido con un microtomo de congelación y teñido con lactofenol-azul de algodón, se observó bajo un invertomicroscopio (**Fig. 46C**). En la sección del talo homómero, se diferenciaban las hifas agrupadas y las paredes soldadas formando un pseudotejido, paraplecténquima, ya que las paredes no estaban engrosadas y las hifas se disponían en todas direcciones, observándose lo mismo en un corte longitudinal que en uno transversal. Este líquen presentaba un pseudocórtex en las dos caras, y en la parte central, los pseudofilamentos de *Nostoc* estaban mezclados con las hifas de manera desordenada (**Fig. 47A**).

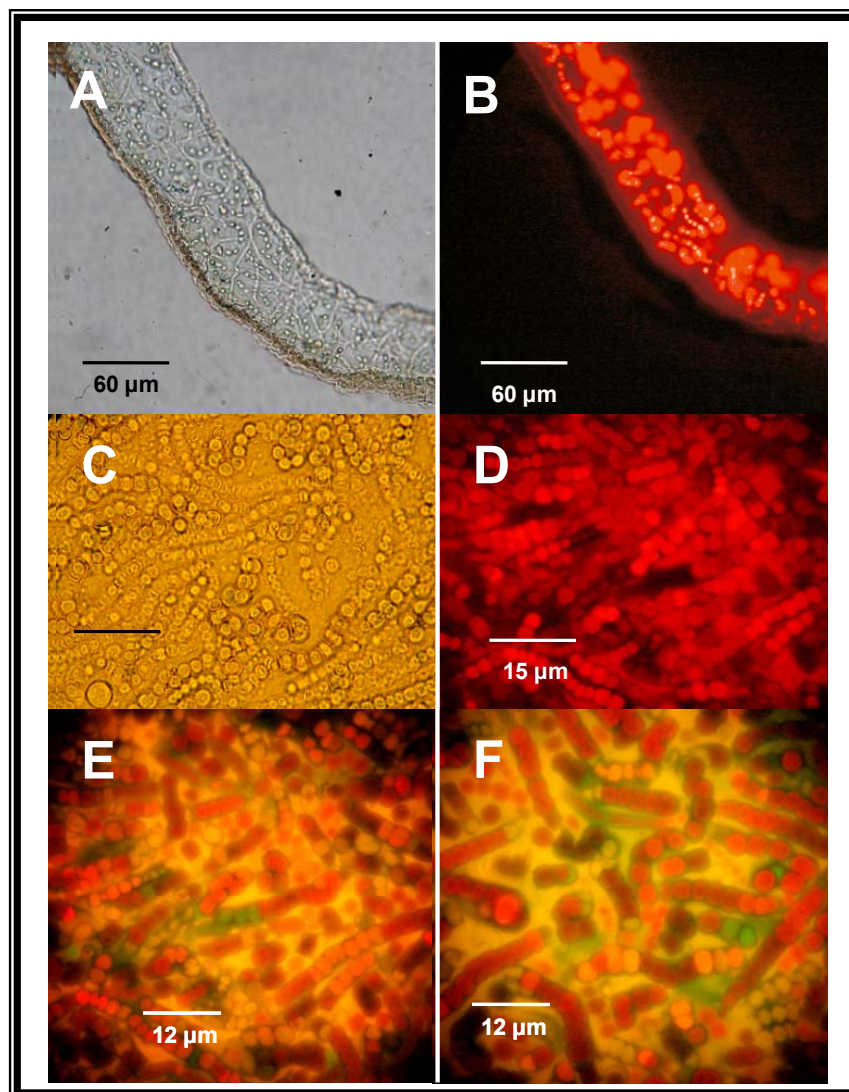


Figura 47. Unión de la arginasa marcada con ITCF a los cianobiontes de *L. corniculatum*. (A) Sección del talo de *L. corniculatum* bajo el microscopio de campo claro y (B) bajo el de fluorescencia. (C) Cianobiontes recién aislados observados con microscopía óptica y (D) con microscopía de fluorescencia. (E) y (F) Cianobiontes tras 1 h en contacto con una solución de la lectina segregada de *L. corniculatum* marcada con ITCF ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) bajo luz azul del microscopio de fluorescencia.

Después de la incubación con la arginasa marcada, algunas células de *Nostoc* mostraban una intensa emisión de fluorescencia verde en su pared celular (**Fig. 47E y F**).

Resultados similares fueron encontrados cuando los clorobiontes de *E. prunastri* se incubaron con la arginasa marcada de *Leptogium*, aunque la emisión de fluorescencia fue más leve que la observada en las cianobacterias homólogas (**Fig.48**).

La desorción de la lectina de la correspondiente pared celular se logró mediante incubación de las células marcadas con α -D-galactosa 100 mM durante 1 h, recuperando así casi el total de la fluorescencia en el sobrenadante.

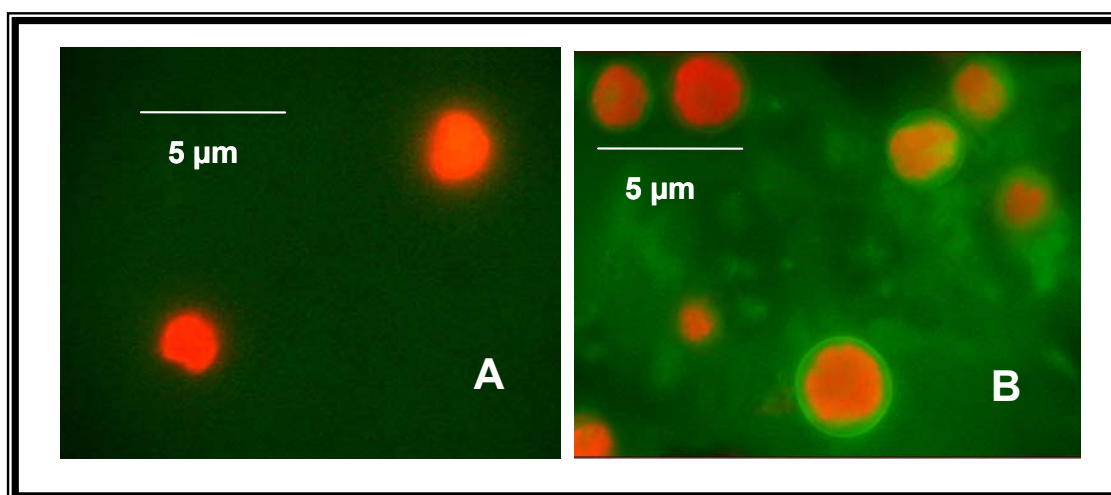


Figura 48. Unión de la arginasa segregable de *L. conriculatum* marcada con ITCF a los clorobiontes de *E. prunastri*. (A) Células de *Evernia* sin ningún tratamiento. (B) Células de *Evernia* después de 1 h en contacto con una solución de arginasa marcada de *L. conriculatum* observadas bajo la luz azul del microscopio de fluorescencia.

8. EFECTOS DE LA LECTINA FÚNGICA Y LA PUTRESCINA SOBRE EL CLOROPLASTO DE LOS CLOROBIONTES

8.1. Actividad del fotosistema II (Reacción de Hill)

A continuación se muestran los valores de la actividad del fotosistema II de las algas recién aisladas de talos de *E. prunastri* sometidas a los distintos tratamientos indicados en el apartado 9 de Material y Métodos (**Tabla VI**). Dicho valor es la razón entre la velocidad de reacción, dada por la disminución de D.O. a 600 nm del DCPIP en contacto con el material fotosintético de las algas, y la concentración de clorofilas totales.

Tabla VI. Valores de la suma de las concentraciones de las clorofilas a y b en $\mu\text{g mL}^{-1}$, velocidad de reacción en unidades de absorbancia por minuto y actividad del fotosistema II en $\text{UA mL min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de los extractos de clorofilas de los clorobiontes.

MUESTRA	[Chla + Chlb] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	V_r (UA min^{-1})	Actividad P_{680} ($\text{UA mL min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$)
Control	13,61	$1,6 \times 10^{-3}$	$1,18 \times 10^{-4}$
PUT 5mM	8,72	$1,8 \times 10^{-3}$	$2,06 \times 10^{-4}$
PUT 7mM	7,31	$0,4 \times 10^{-3}$	$0,55 \times 10^{-4}$
Urea	11,8	2×10^{-3}	$1,69 \times 10^{-4}$
Arginasa	16,65	$3,6 \times 10^{-3}$	$2,16 \times 10^{-4}$
Urea + Arginasa	9,16	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,53 \times 10^{-4}$
Urea + α -galactosidasa + arginasa	7,09	$1,6 \times 10^{-3}$	$2,26 \times 10^{-4}$

El contenido de clorofilas en las algas control resultó ser el más alto excepto en el caso de la incubación con la arginasa. A medida que la concentración de putrescina iba aumentando la concentración de clorofilas iba disminuyendo, lo que ocasionó una pérdida casi total de actividad con PUT 7 mM. El valor de la velocidad de reacción con la concentración de 5 mM fue anormalmente alto, y por tanto, también el de la actividad del fotosistema II.

La incubación de las algas con urea dio lugar a una mayor actividad por sí sola que la encontrada en el grupo control aunque la cantidad de clorofilas fuera menor. Por el contrario, el contenido en clorofilas de las algas al tratarlas con la arginasa subió de 13,61 a 16,65 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y a su vez, la velocidad de reacción también se vio incrementada, por lo que la actividad del P_{680} resultó ser casi el doble que la del control. La combinación de los dos tratamientos anteriores dio valores de velocidad de reacción y actividad del fotosistema II muy similares a los del control. La acción de la enzima α -galactosidasa sobre las algas dio el valor más bajo de concentración de clorofilas (muy similar al de PUT 7 mM) y, por tanto, el más alto de actividad del fotosistema II, aunque la velocidad de reacción fuera semejante a la del control.

8.2. Espectros de Absorción

A continuación se presentan los espectros de absorción de todos los extractos clorofílicos de las algas de *E. prunastri* mostrando las unidades de absorbancia en ordenadas y la longitud de onda, en abcisas, en un rango comprendido entre 370 y 800 nm. Los números señalan los picos y valles de cada espectro, de los que se indica su absorbancia y longitud de onda en la parte superior de cada gráfico.

El pico secundario de absorción en la zona del rojo estuvo siempre localizado en 666 nm, sin que se observara ningún desplazamiento significativo pero siendo siempre la absorbancia de éste en el control mayor que en cualquiera de los tratamientos.

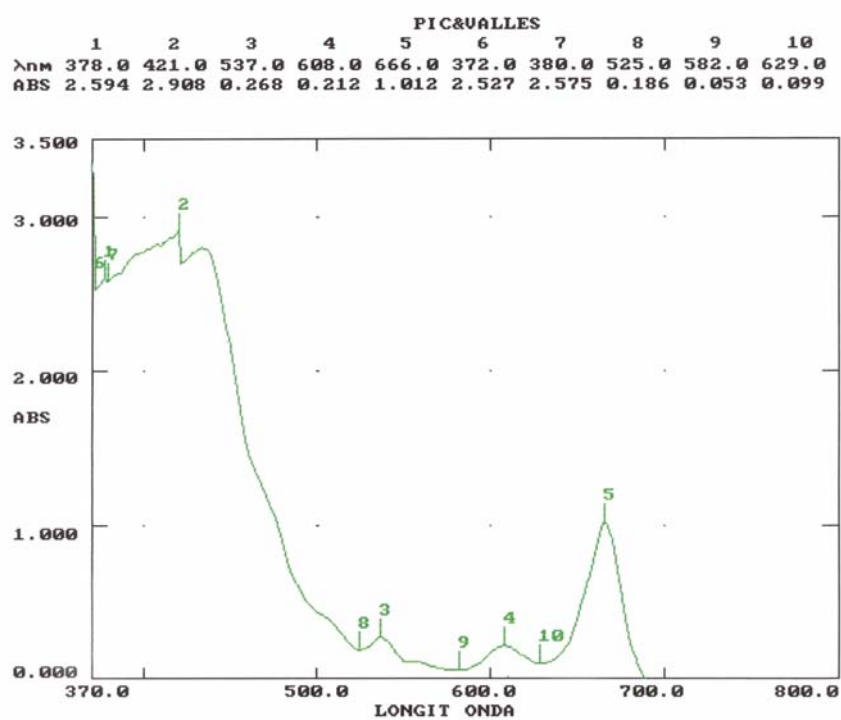


Figura 49. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas control.

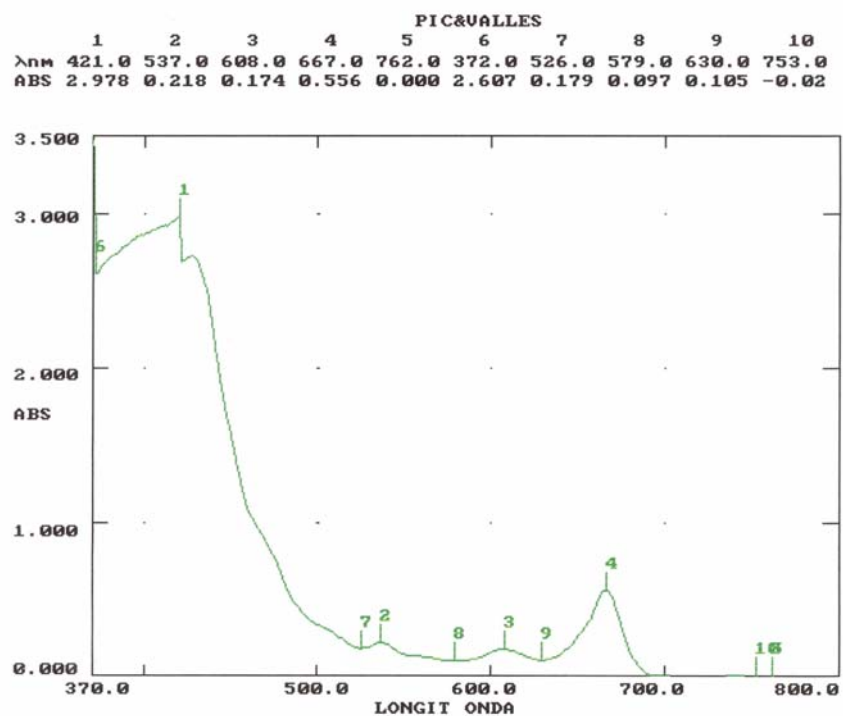


Figura 50. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en una solución de PUT 5 mM.

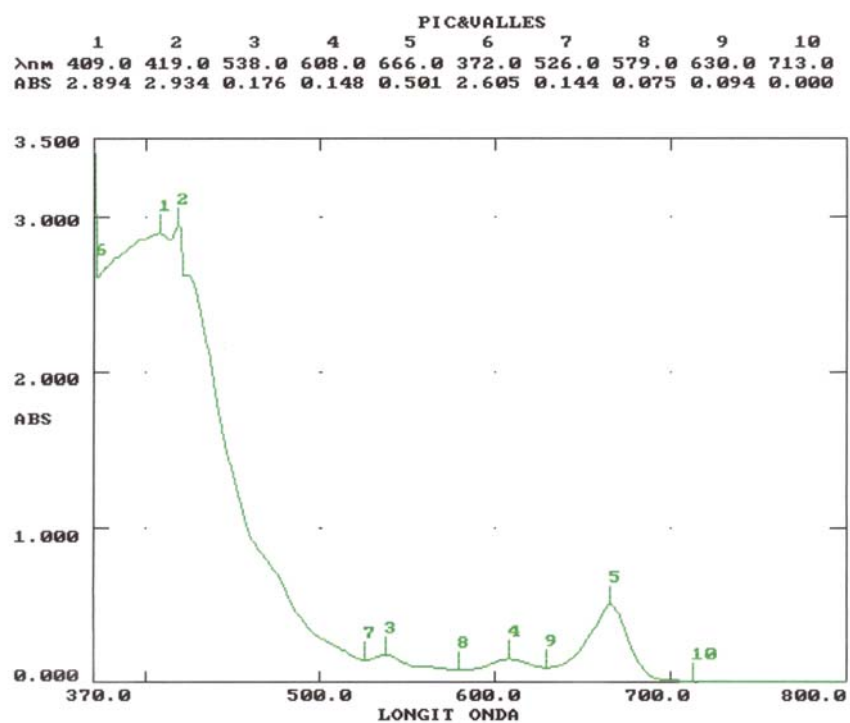


Figura 51. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en una solución de PUT 7 mM.

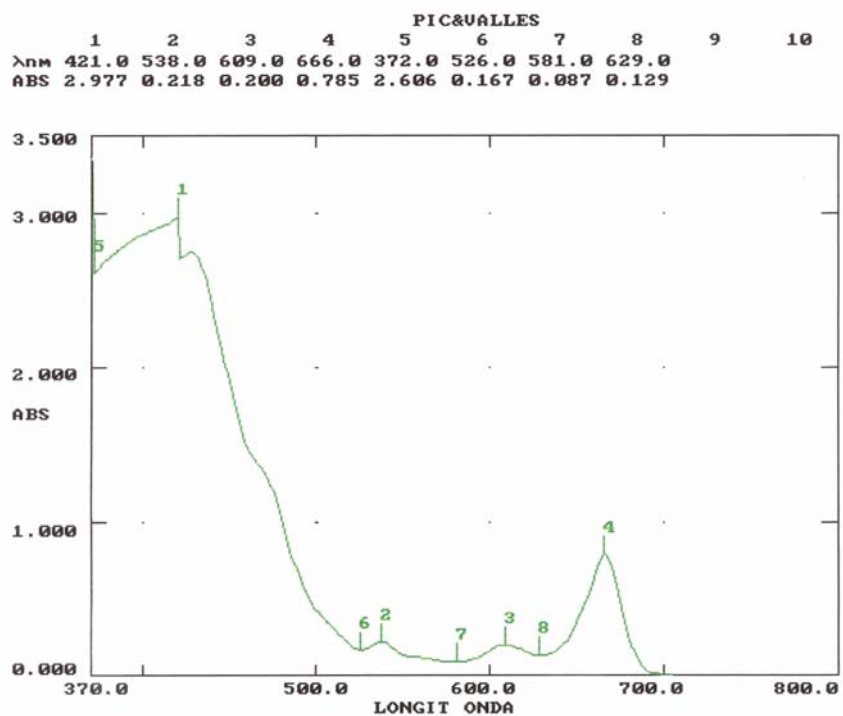


Figura 52. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en una solución de urea 40 mM.

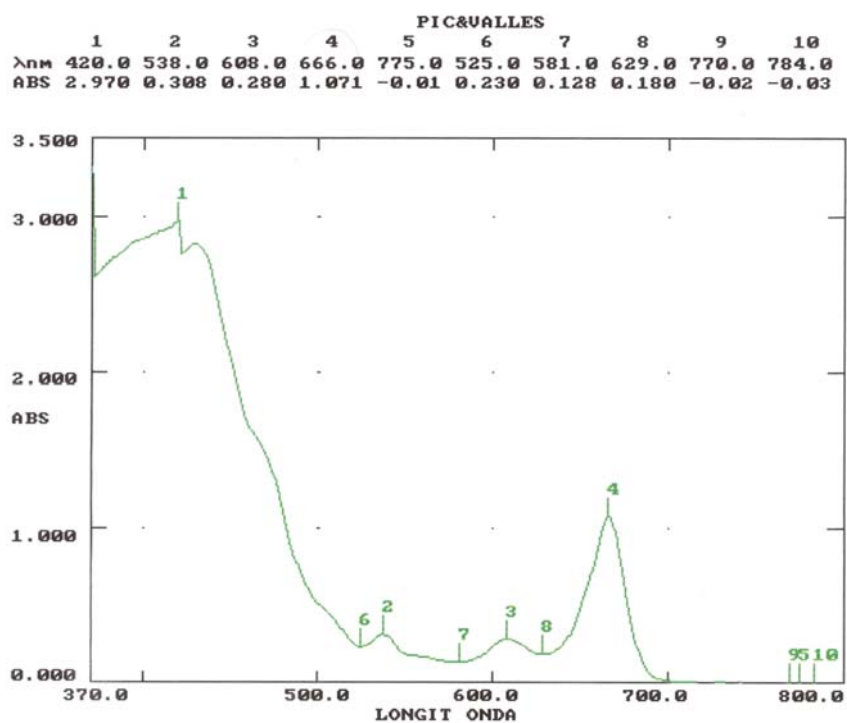


Figura 53. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en la lectina fúngica.

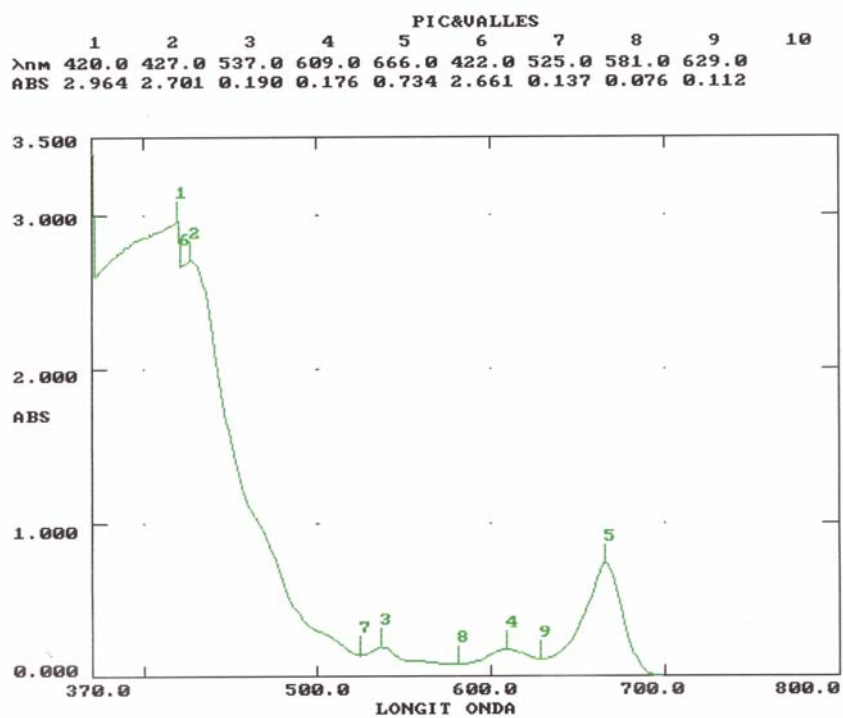


Figura 54. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en urea 40 mM y arginasa.

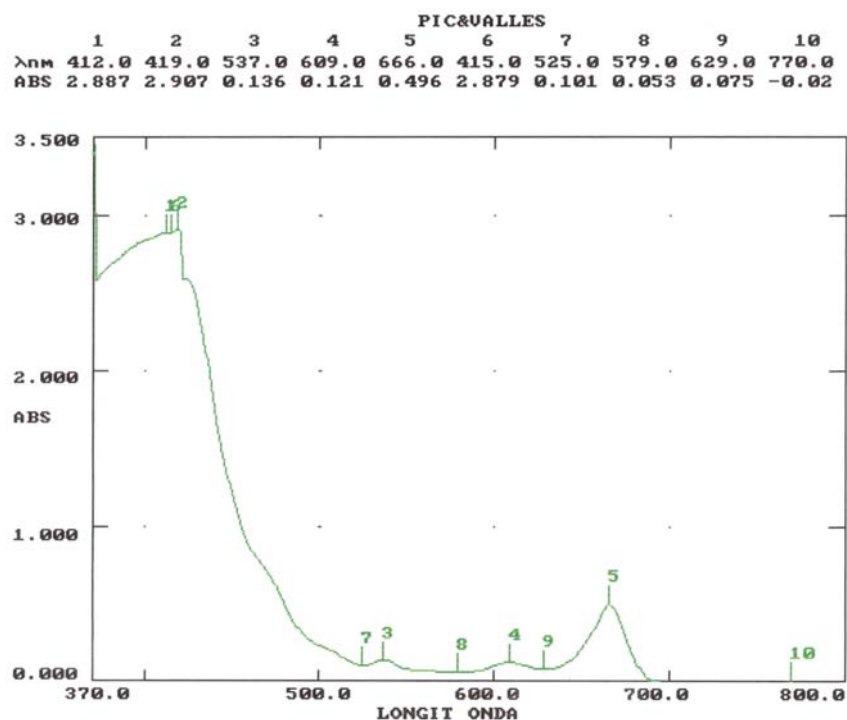


Figura 55. Espectro de absorción del extracto clorofílico de las algas incubadas en urea 40 mM, α -1,4-galactosidasa y arginasa.

En la **tabla VII** se resumen los resultados observados en los espectros de absorbancia de las clorofilas de las algas extraídas con acetona. Se muestra la magnitud de absorbancia que se obtuvo en cada pico del espectro para cada tratamiento.

En primer lugar, los máximos de absorción en el azul de ambas clorofilas *a* y *b* de las distintas muestras se localizaron siempre desplazados hacia la izquierda del espectro, encontrándose los máximos a 421 y 427 nm, respectivamente. En la zona del rojo, el máximo de clorofila *a* se detectó en todos los espectros a 666 nm y el de clorofila *b* a 608 nm, posiblemente por la extracción de las mismas con acetona.

Tabla VII .Valores de Absorbancia (UA) de cada uno los máximos más representativos de los espectros de absorción de los extractos clorofílicos de las algas de *E. prunastri* según los distintos tratamientos.

$\lambda_{\text{máximos}}$ (nm)	421	427	608	666
Control	2,908	2,800	0,212	1,012
PUT 5mM	2,978	2,750	0,174	0,556
PUT 7mM	2,938	2,625	0,148	0,501
Urea	2,977	2,750	0,200	0,785
Arginasa	2,970	2,850	0,280	1,071
Urea + Arginasa	2,964	2,701	0,176	0,734
Urea + α -galactosidasa + Arginasa	2,907	2,600	0,121	0,496

Los valores de absorbancia para cada máximo fueron menores según aumentaba la concentración de putrescina, llegando incluso a disminuir en un 50 % en el máximo a 666 nm. De igual manera, se observó un desplazamiento hacia el azul del hombro en torno a 427-430 nm de las algas control, llegándose a solapar con el primer máximo en el caso del tratamiento con putrescina 7 mM. En este último caso se observó un desdoblamiento del primer máximo de absorción, que en los otros espectros se encontraba a 421 nm, por dos máximos a 409 y 419 nm.

El tratamiento con urea no reportó demasiados cambios salvo un ligero descenso en la absorbancia a 427, 608 y 666 nm con respecto al control. Con la lectina fúngica se obtuvo el efecto contrario, es decir, un incremento de la absorbancia para todos los máximos, guardando relación con los valores más altos de las concentraciones de clorofilas *a* y *b* hallados en el apartado anterior (**Tabla VI**). El efecto combinado de la urea y la arginasa juntas fue más parecido al provocado por la urea por separado, dando lugar por tanto, a una bajada generalizada de la absorbancia. Por último, si se comparan los resultados de absorbancia del tratamiento con urea, α -galactosidasa y arginasa con los de putrescina 7 mM existe una gran similitud tanto en el descenso de la absorbancia, sobre todo en los tres últimos

máximos de absorción, como en el desdoblamiento del primer máximo, que en este caso resultó en dos a 412 y 419 nm, además de la desaparición del hombro a 427 nm que se encontraba en el extracto de las algas control.

8.3. Espectros de Fluorescencia

A continuación se muestran los espectros de fluorescencia de cada extracto de clorofilas indicando en cada caso el rango de longitud de onda en el que se ha barrido el espectro, los máximos de emisión o de excitación y la intensidad de fluorescencia en porcentaje (% F) de cada uno.

La incubación de las algas control con putrescina 5 mM y 7 mM incrementa por 2,0 y 2,75 respectivamente la emisión de fluorescencia de los extractos en un máximo a 750 nm y λ de excitación de 440 nm (**Figs. 56-58**). Un incremento semejante al último (2,6 veces más de emisión a 750 nm) sólo se lograba con clorofilas extraídas de algas incubadas en urea, α -galactosidasa y arginasa (**Fig. 62**). El incremento en la emisión de fluorescencia global producido por la putrescina podría interpretarse en principio, como un aumento de la fotoexcitabilidad de los complejos clorofila-proteína, mediado por la interacción de cargas positivas aportadas por la diamina, antes que como un aumento de la cantidad de clorofilas extraíbles por el disolvente, que estaría en desacuerdo con los datos de la **tabla VI**.

$\lambda_{\text{máx}} = 750 \text{ nm}$ $F_{750\text{nm}} = 3,5$

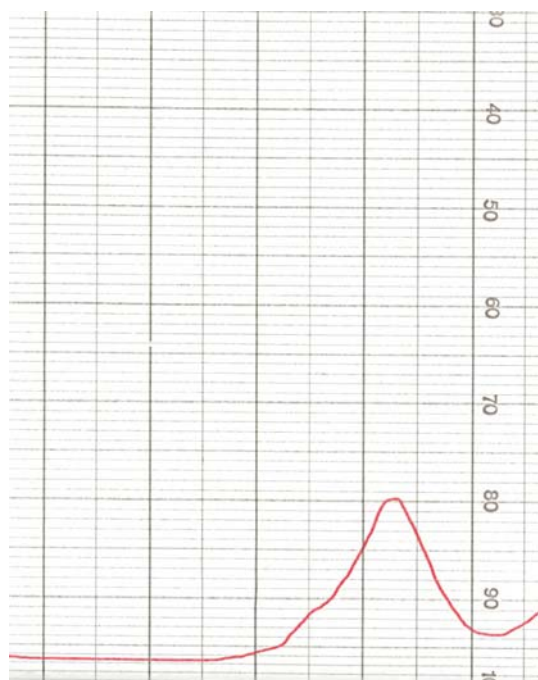


Figura 56. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas control.

$\lambda_{\text{máx}} = 750 \text{ nm}$ $F_{750\text{nm}} = 7$

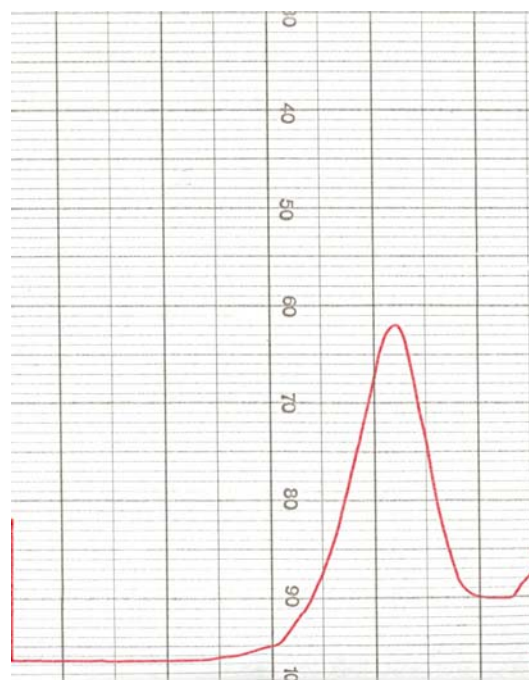


Figura 57. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas en PUT 5mM.

$\lambda_{\text{máx}} = 750 \text{ nm}$ $F_{750\text{nm}} = 9,6$

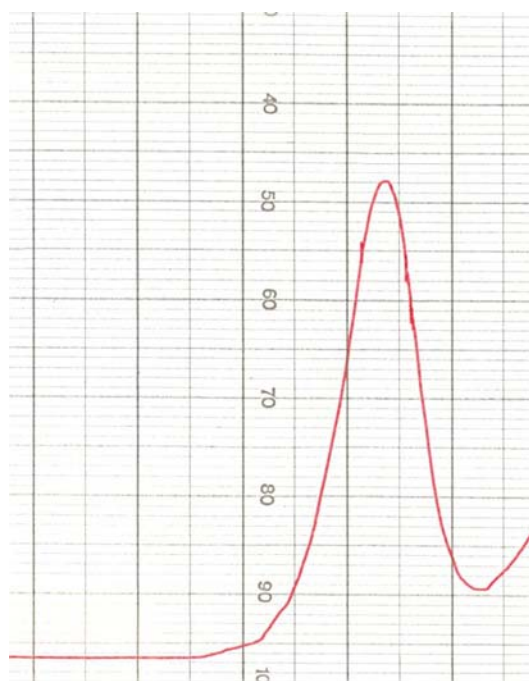


Figura 58. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas en PUT 7mM.

$\lambda_{\text{máx}} = 750 \text{ nm}$ $F_{750\text{nm}} = 4,8$

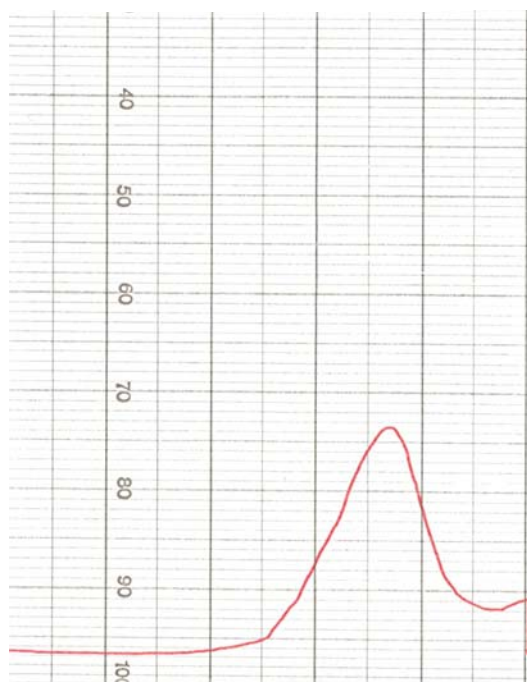


Figura 59. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas con urea.

$\lambda_{\text{máx}} = 750 \text{ nm}$ $F_{750\text{nm}} = 4,4$

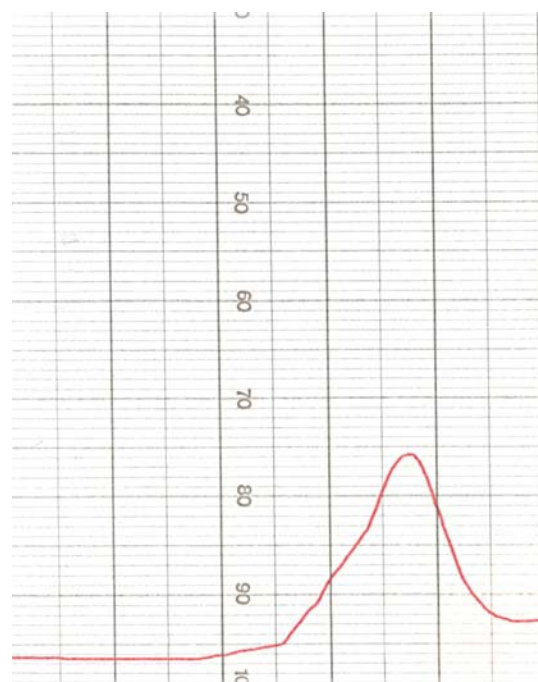


Figura 60. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas con arginasa.

$\lambda_{\text{máx}} = 750 \text{ nm}$ $F_{750\text{nm}} = 6,1$

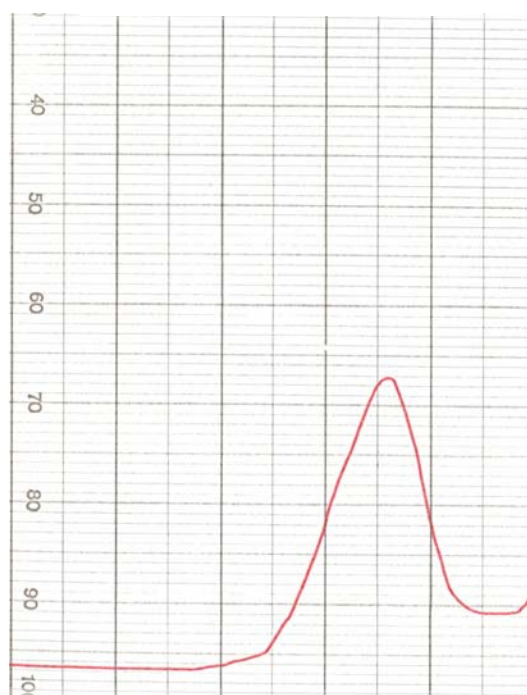


Figura 61. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas con urea y arginasa.

$\lambda_{\text{máx}} = 750 \text{ nm}$ $F_{750\text{nm}} = 9,1$

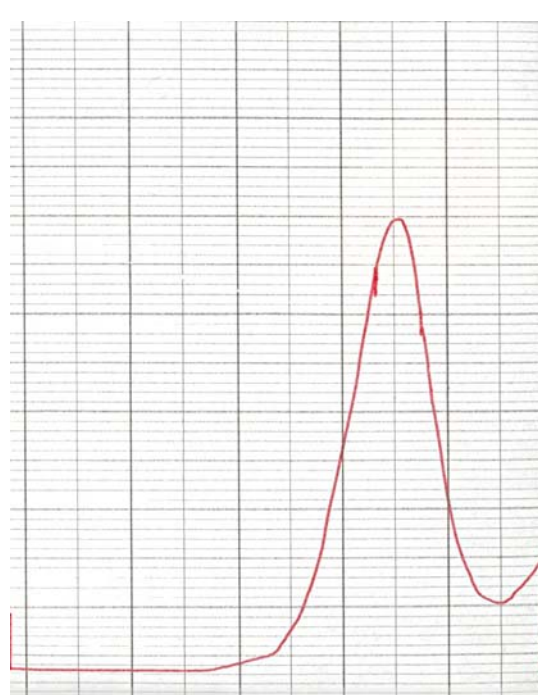


Figura 62. Espectro de emisión entre 600 y 800 nm con λ de excitación a 440 nm de las algas incubadas con urea, α -1,4-galactosidasa y arginasa.

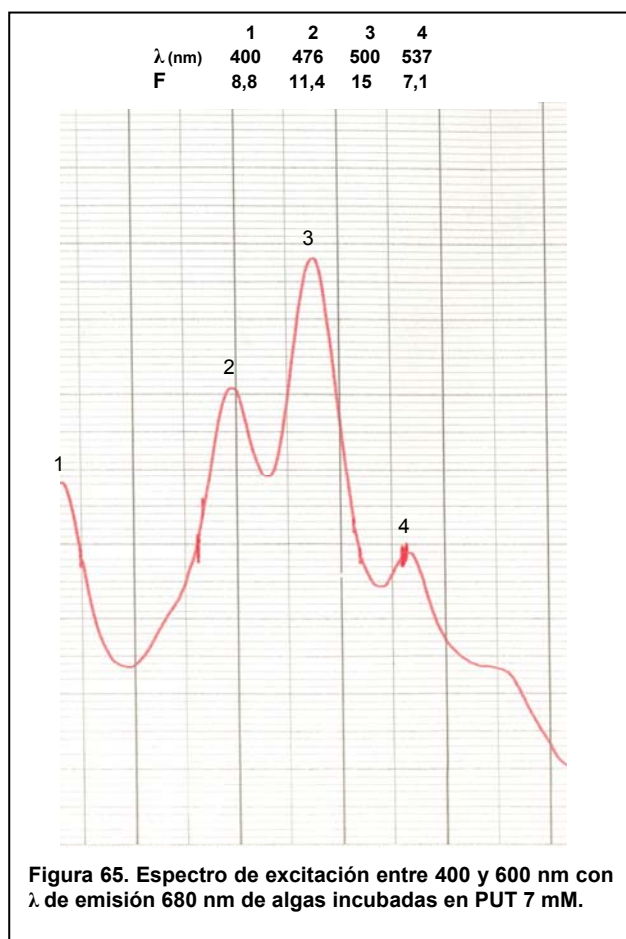
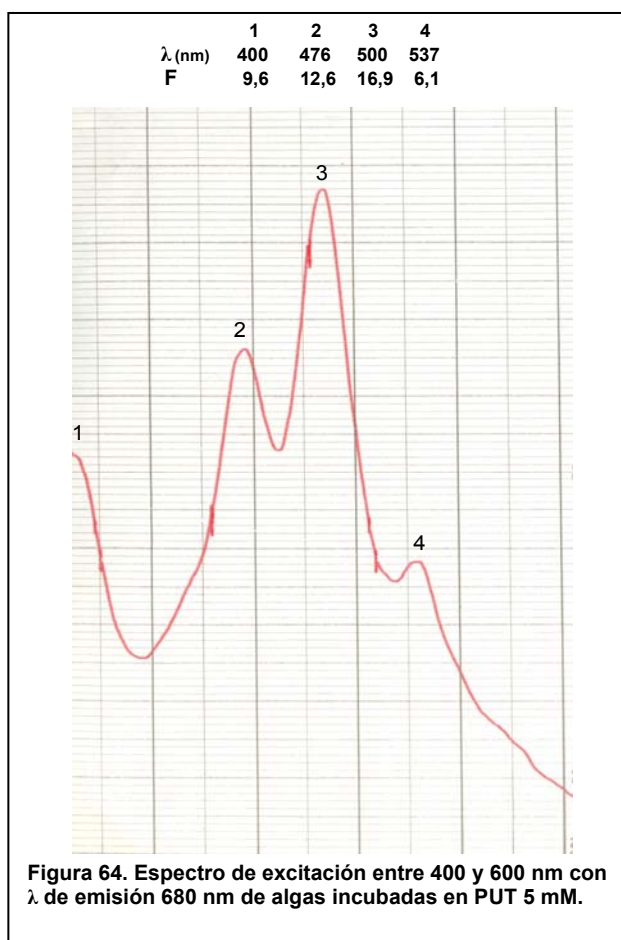
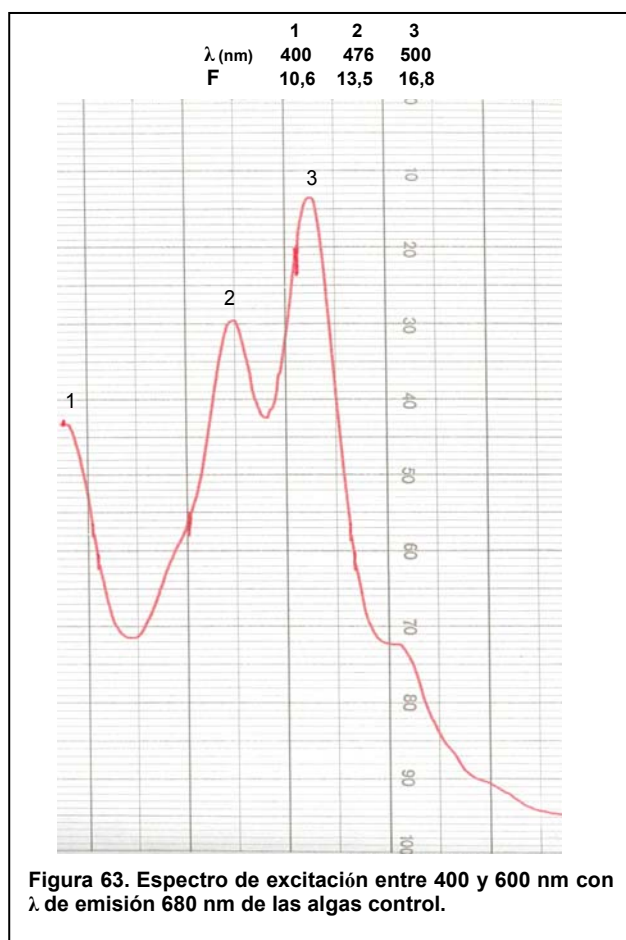
La **tabla VIII** resume los valores de emisión de fluorescencia obtenidos a partir de los espectros de los extractos de clorofila de las algas previamente tratadas según se indique. La excitación se produjo a 440 nm obteniéndose emisión de fluorescencia a 750 nm.

Tabla VIII. Emisión de Fluorescencia entre 600 y 800 nm con una λ de excitación de 440 nm para cada uno de los tratamientos de las algas.

$\lambda_{\text{máximos}}$ (nm)	750
Control	3,5
PUT 5mM	7
PUT 7mM	9,6
Urea	4,8
Arginasa	4,4
Urea + Arginasa	6,1
Urea + α -galactosidasa + Arginasa	9,1

Al variar la longitud de onda de excitación para una λ de emisión fija (680nm), sólo se produjo un descenso significativo en la fluorescencia a 680 nm tras los tratamientos con PUT 5 y 7 mM (**Figs. 63-65**) y el tratamiento formado por las incubaciones sucesivas en urea, α -galactosidasa y arginasa (**Fig. 69**), preferentemente en la zona de excitación propia de las clorofilas y carotenos (400-476 nm).

Un hombro de fluorescencia (**Fig. 63 y 67**) provocado por excitación de 537 nm, también apareció incrementado por tratamientos que implicaban altos niveles de la diamina, tanto aportada exógenamente (**Figs. 64 y 65**) como provocada endógenamente (**Fig. 69**).



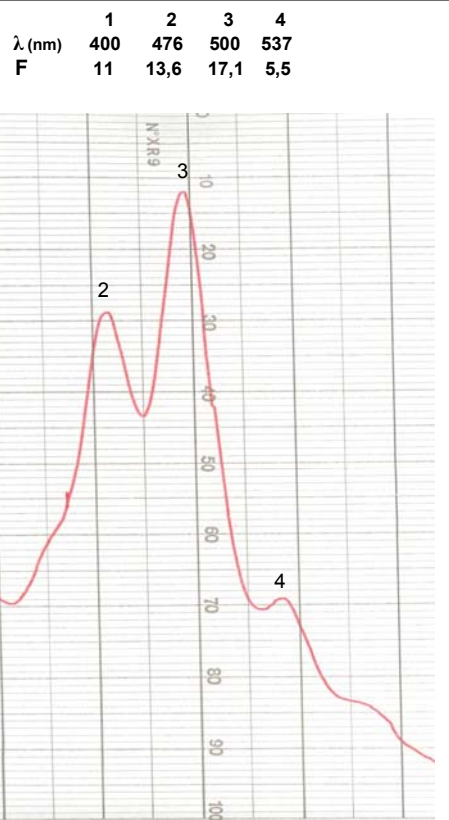


Figura 66. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de las algas incubadas con urea.

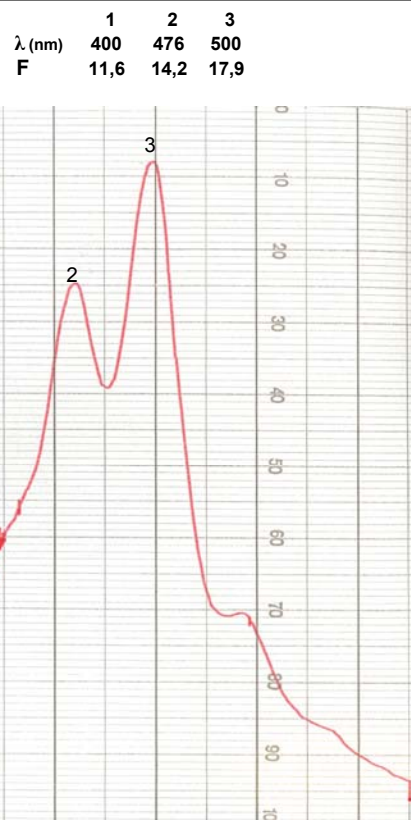


Figura 67. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de las algas incubadas con arginasa.

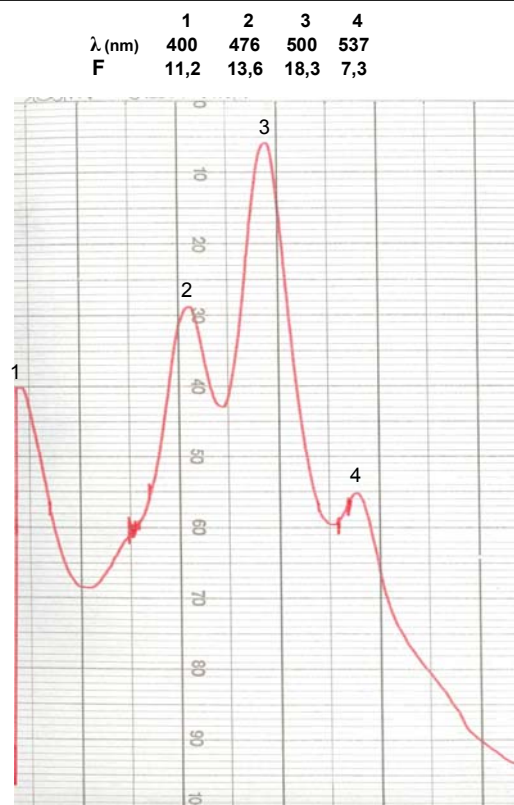


Figura 68. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de las algas incubadas con urea y arginasa.

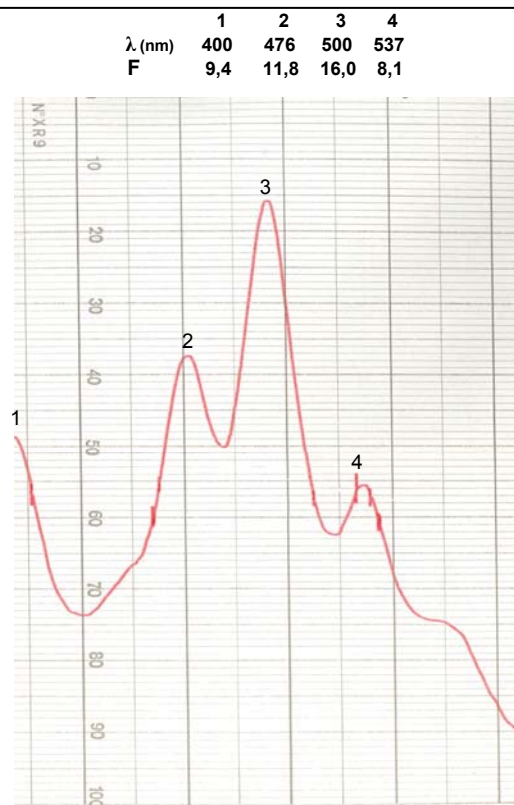


Figura 69. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 680 nm de las algas incubadas con urea, α -1,4-galactosidasa y arginasa.

En la **tabla IX** se resumen los valores de porcentaje de fluorescencia de cada máximo de excitación recogiendo la emisión a una longitud de onda fija de 680 nm para cada tratamiento.

Tabla IX. Fluorescencia de los distintos extractos clorofílicos de las algas aisladas de *E. prunastri*, según los tratamientos correspondientes, a los distintos máximos de excitación provocados por una λ de emisión de 680 nm.

$\lambda_{\text{máximos}}$ (nm)	400	476	500	537
Control	10,6	13,5	16,8	
PUT 5mM	9,6	12,6	16,9	6,1
PUT 7mM	8,8	11,4	15	7,1
Urea	11	13,6	17,1	5,5
Arginasa	11,6	14,2	17,9	
Urea + Arginasa	11,2	13,6	18,3	7,3
Urea + α -galactosidasa + Arginasa	9,4	11,8	16,0	8,1

Los valores de los máximos de emisión de fluorescencia a 715 nm son del orden de 10 veces inferiores a los registrados a 680 nm. El máximo principal fue emitido tras excitación con luz de 500-510 nm (**Figs. 70-76**). Esto parece indicar que el fotosistema I estaría a una concentración mucho más baja que el fotosistema II o que es mucho más lábil.

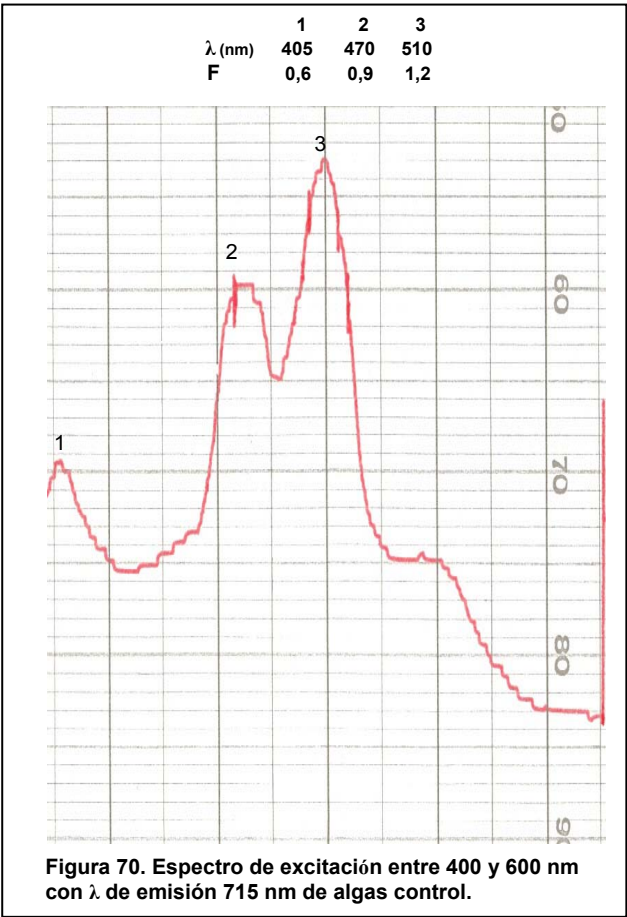


Figura 70. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm con λ de emisión 715 nm de algas control.

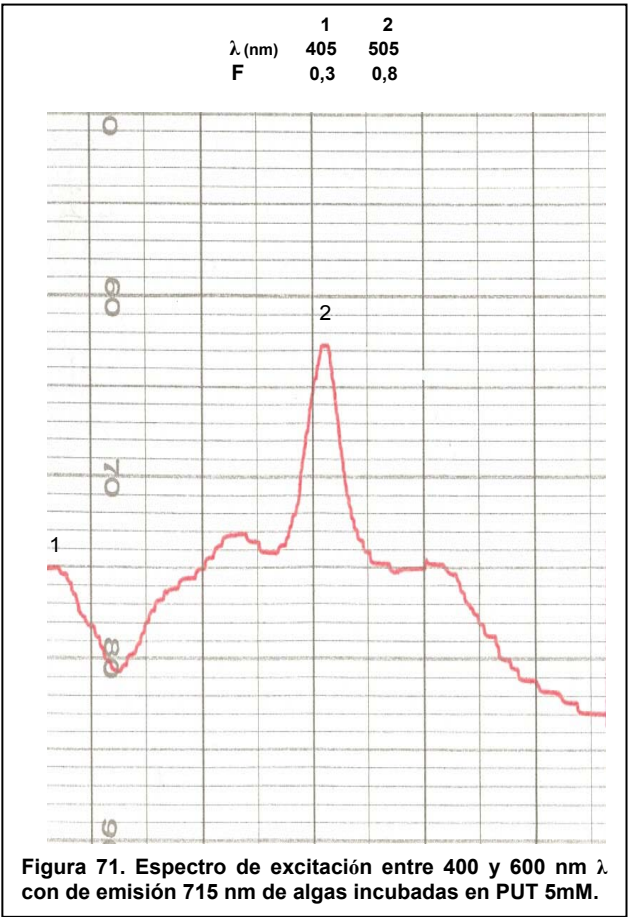


Figura 71. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm λ con de emisión 715 nm de algas incubadas en PUT 5mM.

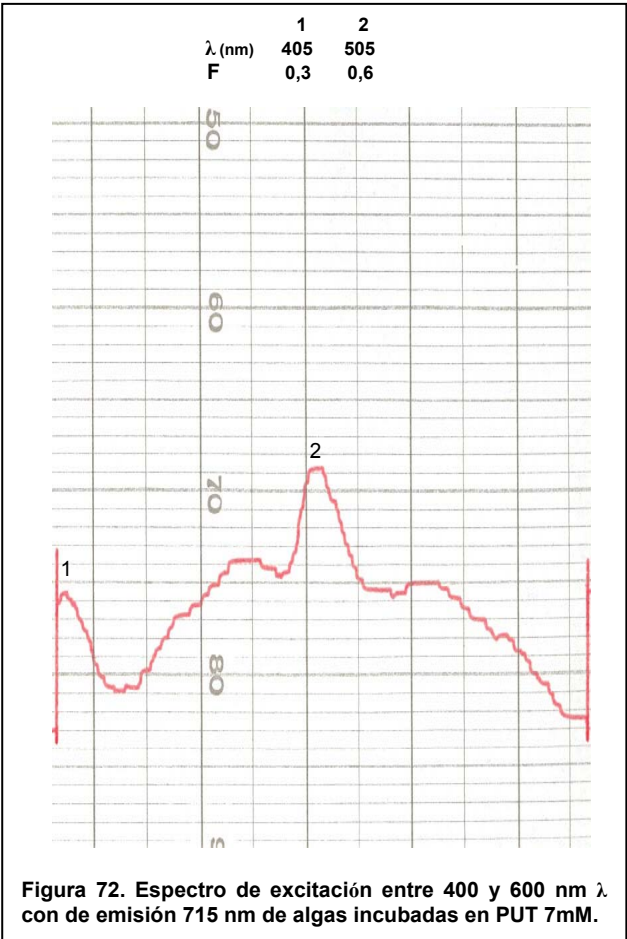
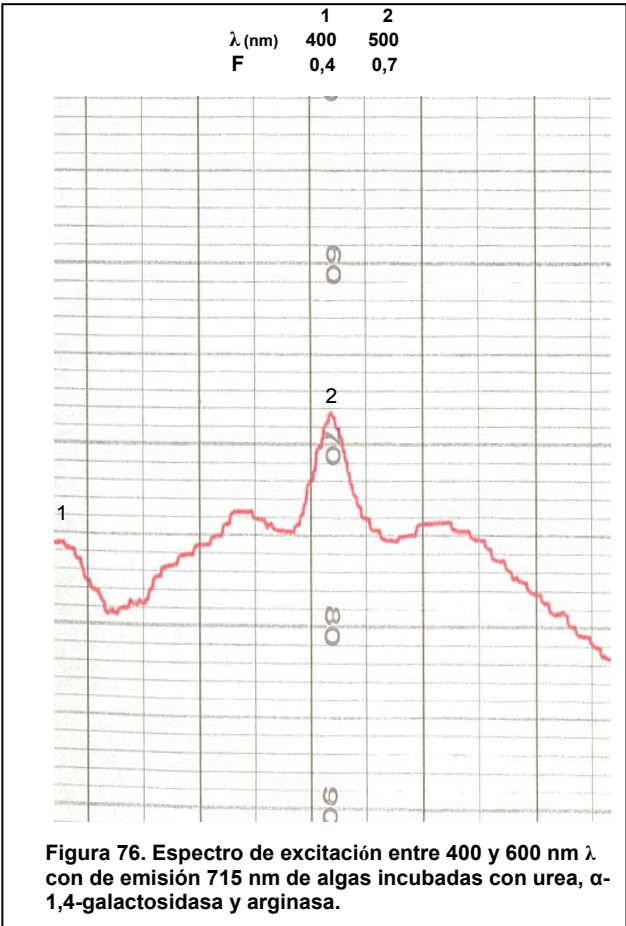
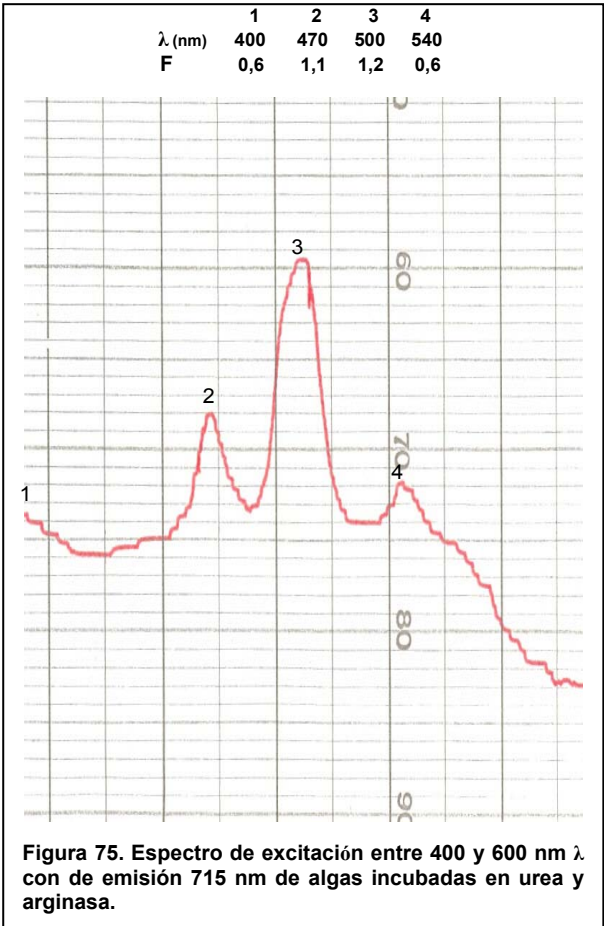
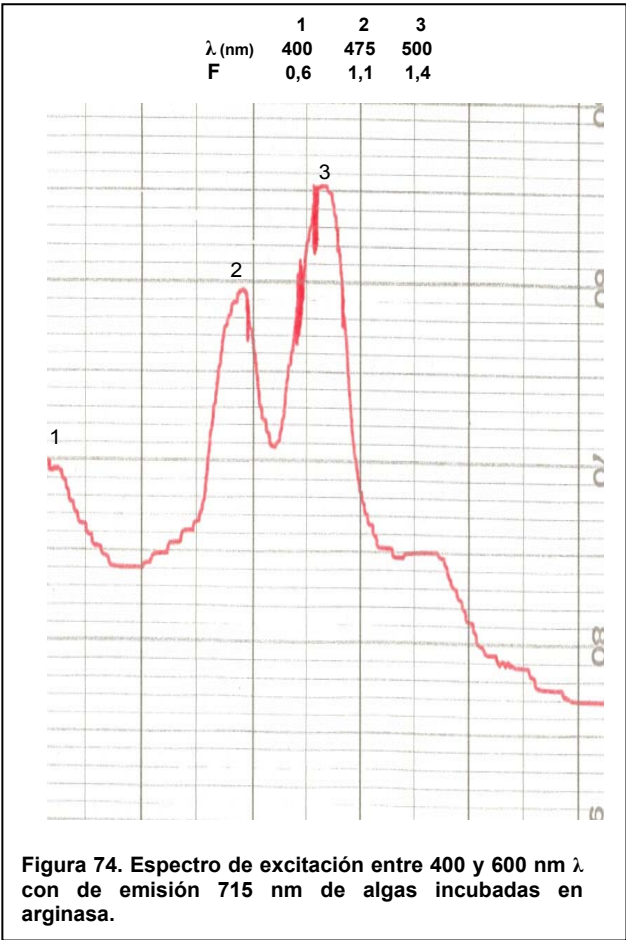
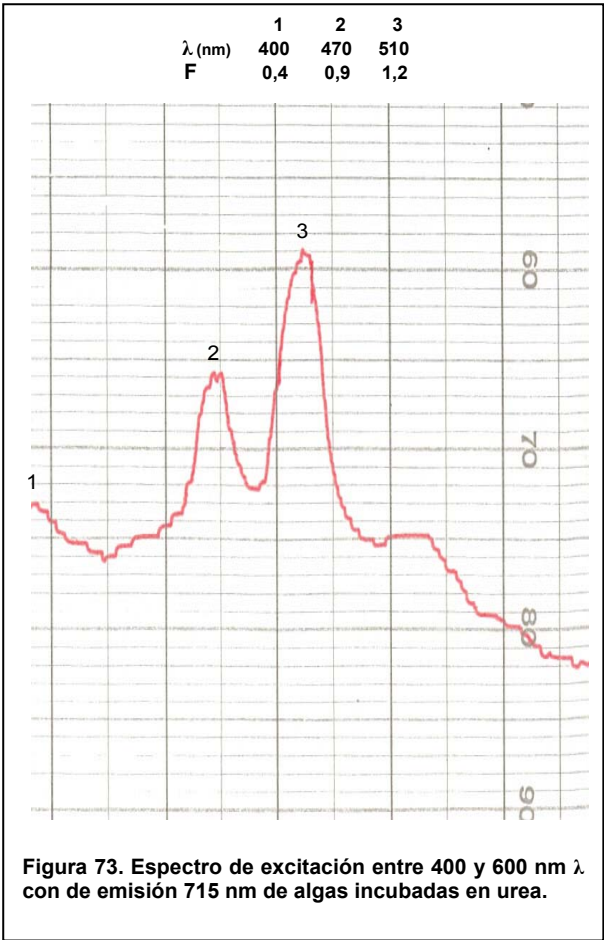


Figura 72. Espectro de excitación entre 400 y 600 nm λ con de emisión 715 nm de algas incubadas en PUT 7mM.



A partir de los espectros de excitación de las clorofilas mediante luz de 715 nm se ha elaborado la **tabla X** con los valores correspondientes de fluorescencia para cada máximo de excitación y tratamiento.

Tabla X. Fluorescencia de los distintos extractos clorofilicos de las algas aisladas de *E. prunastri*, según los tratamientos correspondientes, a los distintos máximos de excitación provocados por una λ de emisión de 715 nm.

$\lambda_{\text{máximos}}$ (nm)	400-405	470-475	505-510	540
Control	0,6	0,9	1,2	
PUT 5mM	0,3		0,8	
PUT 7mM	0,3		0,6	
Urea	0,4	0,9	1,2	
Arginasa	0,6	1,1	1,4	
Urea + Arginasa	0,6	1,1	1,2	0,6
Urea + α -galactosidasa + Arginasa	0,4		0,7	

En el grupo control se encontraron tres máximos de excitación, a 405, 479 y 510 nm, respectivamente, de los que luego aparecían sólo dos, de 405 y 505 nm en los tratamientos con putrescina con menores valores de fluorescencia.

Las incubaciones con urea y arginasa por separado mantuvieron los tres máximos de excitación del control, y el efecto combinado de las dos dio lugar a un cuarto máximo a 540 nm. El tratamiento formado por las incubaciones con urea, α -galactosidasa y arginasa siguió la misma línea que las algas en contacto con la diamina, es decir, dos máximos a 400 y 500 nm, respectivamente y con una señal de fluorescencia semejante.

8.4. Estudio de los complejos clorofila-proteína por Electroforesis Capilar

El análisis electroforético de los complejos clorofila-proteína aislados según el protocolo descrito en Material y Métodos, apartado 9.3, se describe a continuación, teniendo en cuenta la migración diferencial de las moléculas según su relación carga-masa ($Z^{+/-}/m$). La carga eléctrica de las moléculas viene dada según el punto isoeléctrico de cada proteína al estar disuelta en tampón borato sódico 25 mM, pH 9,2.

Como patrón neutro de referencia se utilizó octilglucósido, presente en todas las muestras, con un tiempo de migración en torno a 10,5 min. La relativización de los tiempos de migración se realizó con respecto al tiempo de migración del octilglucósido para cada análisis en concreto calculando el valor de la movilidad electroforética aparente corregida, μ_a , en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ (**Tablas VII y VIII**).

Tabla XI. Tiempos de migración en minutos y movilidades electroforéticas en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$, de cada uno de los picos de los electroferogramas correspondientes a las muestras de complejos clorofila-proteína obtenidas a partir de algas aisladas de talos de *E. prunastri* y tratadas con concentraciones crecientes de Putrescina (5mM y 7mM) y su correspondiente control.

Muestra	Detección a 280 nm		Detección a 435 nm	
	t_m^{solute} (min)	μ_a ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$)	t_m^{solute} (min)	μ_a ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$)
Control	2,8	-5,61 $\times 10^{-4}$ *	12,9	17,9 $\times 10^{-4}$
	13	17,3 $\times 10^{-4}$		
	13,5	14,4 $\times 10^{-4}$		
	16,8	6,85 $\times 10^{-4}$		
	18,9	5,14 $\times 10^{-4}$		
Putrescina 5 mM	11,6	24,0 $\times 10^{-4}$	11,4	27,0 $\times 10^{-4}$
	13,5	11,7 $\times 10^{-4}$		
	14,3	9,60 $\times 10^{-4}$		
	16,1	6,85 $\times 10^{-4}$		
	29,5	2,19 $\times 10^{-4}$		
Putrescina 7 mM	11	43,2 $\times 10^{-4}$	11	43,2 $\times 10^{-4}$
	13,3	13,1 $\times 10^{-4}$		
	14	11,0 $\times 10^{-4}$		
	14,4	9,81 $\times 10^{-4}$		
	15,2	8,30 $\times 10^{-4}$		
	15,6	7,71 $\times 10^{-4}$		
	16,2	6,97 $\times 10^{-4}$		
	16,8	6,35 $\times 10^{-4}$		

*Valor negativo de la movilidad aparente corregida dado por un compuesto proteico cuyo tiempo de migración, 2,8 min, es menor que el tiempo de migración del componente neutro, 10,5 min.

Tabla XII. Tiempos de migración en minutos y movilidades electroforéticas en $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$, de cada uno de los picos de los electroferogramas correspondientes a los complejos clorofila-proteína obtenidos a partir de algas aisladas de talos de *E.prunastri*, tratadas con urea 40 mM, arginasa, urea 40 mM y arginasa, y por último, urea, α -galactosidasa y arginasa.

Muestra	Detección a 280 nm		Detección a 435 nm	
	t_m^{solute} (min)	μ_a ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$)	t_m^{solute} (min)	μ_a ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$)
Urea 40 mM	15,9	$7,1 \times 10^{-4}$	18,6 21,4 22,5	$4,9 \times 10^{-4}$ $3,7 \times 10^{-4}$ $3,4 \times 10^{-4}$
	18,6	$4,9 \times 10^{-4}$		
	21,4	$3,7 \times 10^{-4}$		
	22,5	$3,4 \times 10^{-4}$		
	30,9	$2,1 \times 10^{-4}$		
	32,8	$1,9 \times 10^{-4}$		
Arginasa	12,9	$14,9 \times 10^{-4}$	17,8	$5,5 \times 10^{-4}$
	15,4	8×10^{-4}		
	17,7	$5,6 \times 10^{-4}$		
	25,3	$2,8 \times 10^{-4}$		
	30	$2,2 \times 10^{-4}$		
	32	$3,6 \times 10^{-4}$		
	32,2	$1,9 \times 10^{-4}$		
	37,5	$1,6 \times 10^{-4}$		
Urea 40 mM + Arginasa	7,4	$-13,45 \times 10^{-4} *$	7,5 16,8 20	$6,9 \times 10^{-4}$ $4,6 \times 10^{-4}$
	13,5	$14,9 \times 10^{-4}$		
	14,7	$10,5 \times 10^{-4}$		
	15,4	9×10^{-4}		
	16	8×10^{-4}		
	16,8	$6,9 \times 10^{-4}$		
	20	$4,6 \times 10^{-4}$		
	26,6	$2,7 \times 10^{-4}$		
	28,7	$2,4 \times 10^{-4}$		
	33,5	$1,9 \times 10^{-4}$		
	43,5	$1,3 \times 10^{-4}$		
Urea + α -galactosidasa + Arginasa	10,5	$43,2 \times 10^{-4}$	11,7 12,6 15 15,2 16,1 19,4 19,9 22,5 30,2 42,2 43,4	$19,6 \times 10^{-4}$ $13,9 \times 10^{-4}$ $7,9 \times 10^{-4}$ $7,6 \times 10^{-4}$ $6,5 \times 10^{-4}$ $4,4 \times 10^{-4}$ $4,1 \times 10^{-4}$ $3,3 \times 10^{-4}$ $2,1 \times 10^{-4}$ $1,3 \times 10^{-4}$ $1,2 \times 10^{-4}$
	11,1	27×10^{-4}		
	11,7	$19,6 \times 10^{-4}$		
	12,6	$13,9 \times 10^{-4}$		
	15	$7,9 \times 10^{-4}$		
	15,2	$7,6 \times 10^{-4}$		
	16,1	$6,5 \times 10^{-4}$		
	19,4	$4,4 \times 10^{-4}$		
	19,9	$4,1 \times 10^{-4}$		
	22,5	$3,3 \times 10^{-4}$		
	30,2	$2,1 \times 10^{-4}$		
	42,2	$1,3 \times 10^{-4}$		
	43,4	$1,2 \times 10^{-4}$		

*Valor negativo de la movilidad aparente corregida dado por un compuesto proteico cuyo tiempo de migración, 7,4 min, es menor que el tiempo de migración del componente neutro, 10,6 min.

En las algas control aparecían dos picos, tanto a 280 como a 435 nm de absorbancia, con tiempos de migración de 12,9 y 18,9 min y movilidades electroforéticas $17,9 \times 10^{-4}$ y $5,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, respectivamente, por lo que puede decirse que se trata de dos complejos clorofila-proteína cargados negativamente al separarse después del compuesto neutro ($t_m^{\text{neutro}} = 10,5 \text{ min}$), siendo de mayor tamaño el de mayor tiempo de migración (**Fig. 77 y 78, tabla VII**).

Además de estos picos, existían otros mayoritarios en el electroferograma revelado a 280 nm indicando la existencia de sustancias de naturaleza proteica cargadas negativamente y con unos tiempos de migración de 13,5 min ($\mu_a = 1,44 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$) y 16,8 min ($\mu_a = 6,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$). Solamente se detectó un pico anterior al componente neutro, concretamente a 2,8 min ($\mu_a = -5,61 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$), indicativo de una proteína cargada positivamente (**Fig. 77, tabla VII**).

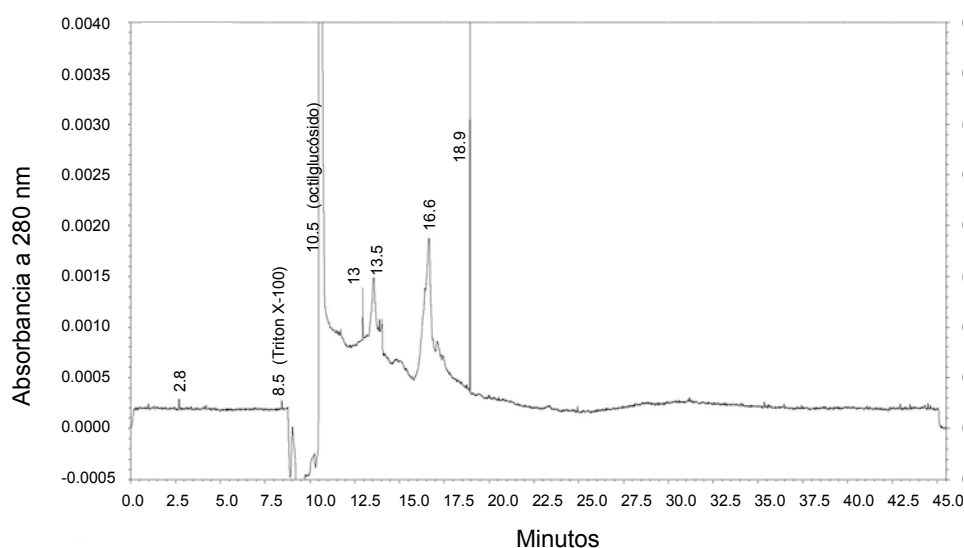


Figura 77. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas control con detección a 280 nm.

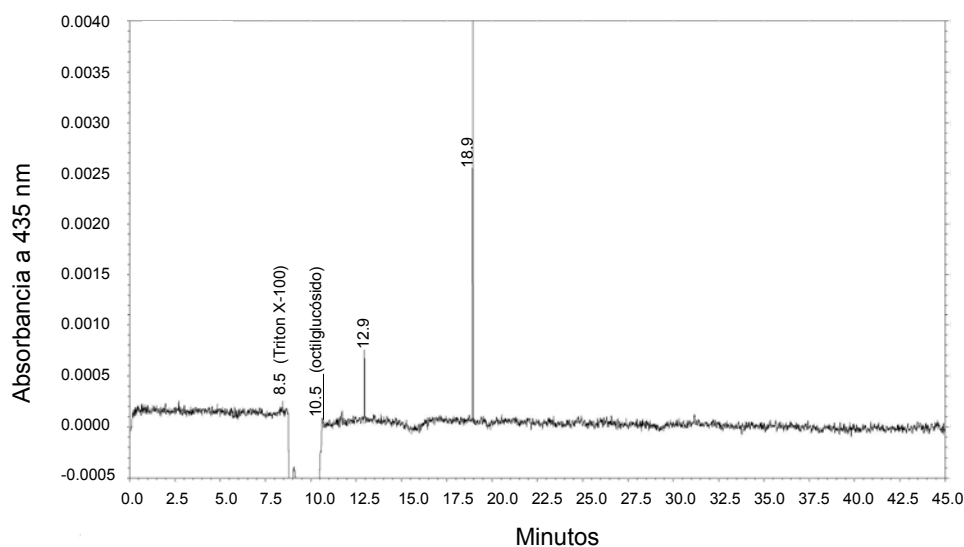


Figura 78. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas control con detección a 435 nm.

Cuando las algas fueron incubadas con putrescina, no se detectó la proteína con carga positiva, y en la zona de las proteínas negativas aparecieron otras nuevas de menor masa molecular. En concreto, con la concentración de putrescina 5 mM los complejos clorofila-proteína, presentes en los electroferogramas monitorizados a 280 y 435 nm (**Fig. 79 y 80**), se detectaron a un menor tiempo de migración que los del control con movilidades electroforéticas en torno a 30×10^{-4} y $10 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$.

Las sustancias de naturaleza proteica presentes en esta muestra fueron semejantes a las del control, apareciendo en la misma zona del análisis electroforético, exceptuando tres proteínas nuevas de μ_a $26,9 \times 10^{-4}$, 10×10^{-4} y $2,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, respectivamente (**Fig. 79**).

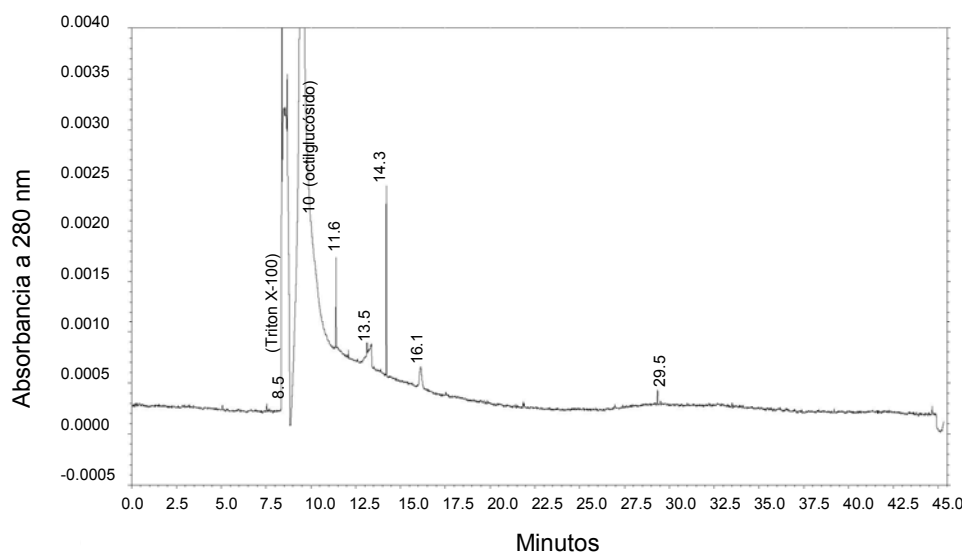


Figura 79. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas con Putrescina 5 mM con detección a 280 nm.

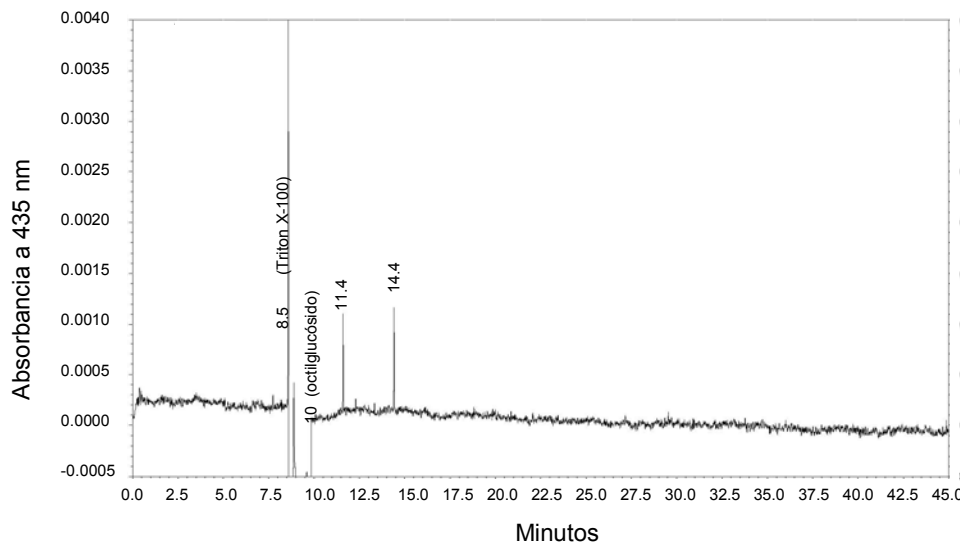


Figura 80. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas con Putrescina 5 mM con detección a 435 nm.

El efecto más marcado de la putrescina 7 mM fue el aumento de asociaciones clorofila-proteína (**Fig. 82**), algunas ya presentes en el tratamiento anterior, y otras de nueva aparición consecuencia de una mayor concentración de la diamina ($\mu_a = 13,5 \times 10^{-4}$, $7,9 \times 10^{-4}$, y $7,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$). Igualmente había un mayor número de proteínas nuevas (**Fig. 81**), con movilidades electroforéticas $11,1 \times 10^{-4}$, $8,5 \times 10^{-4}$ y $7,8 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$; y otras ya encontradas tanto con putrescina 5 mM como en el control ($47,9 \times 10^{-4}$, 10×10^{-4} , $7,1 \times 10^{-4}$ y $6,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$).

Con respecto al control, la putrescina conservaba el complejo clorofila-proteína con un tiempo de migración de 12,8 min ($\mu_a = 17,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$), pasando a ser 11,4 y 11 min en putrescina 5 y 7 mM, respectivamente. En ambos casos, el pico se resolvía antes y por tanto, se correspondía con una disminución en el tamaño, tanto más cuanto mayor era la concentración de la diamina.

Sin embargo, el pico perteneciente al complejo clorofila-proteína de tiempo de migración 18,9 min y $\mu_a = 5,14 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, apareció transformado en numerosos picos más pequeños, anteriores a este tiempo, posiblemente por la desorganización del mismo en otros péptidos más pequeños que pudieran agregar restos de moléculas de clorofila presentes en el medio tras el tratamiento.

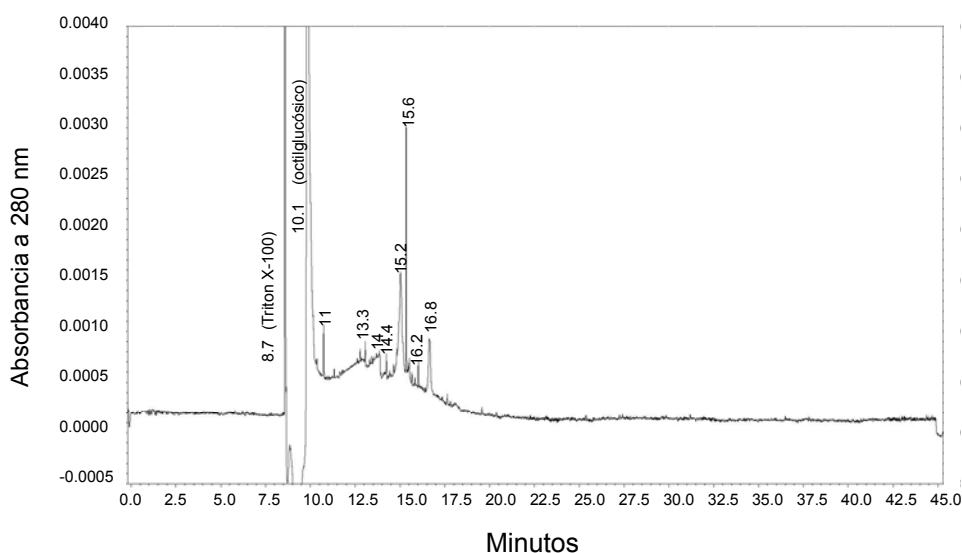


Figura 81. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas con Putrescina 7 mM con detección a 280 nm.

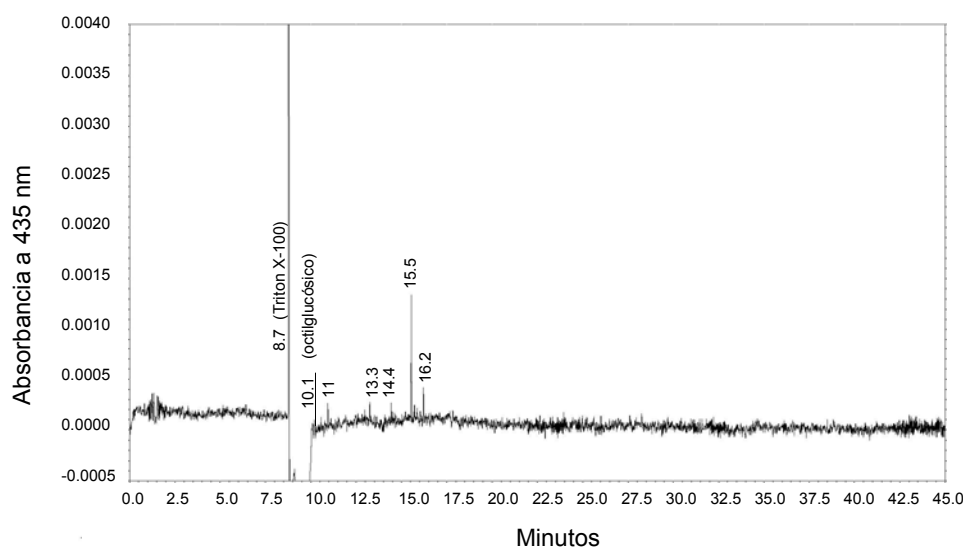


Figura 82. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas con Putrescina 7 mM con detección a 435 nm.

La incubación de las algas recién aisladas de los talos y después incubadas en urea 40 mM durante ocho horas dio lugar a un perfil de picos indicativos de la existencia de proteínas más negativas y de mayor masa molecular que las del control (Fig. 83).

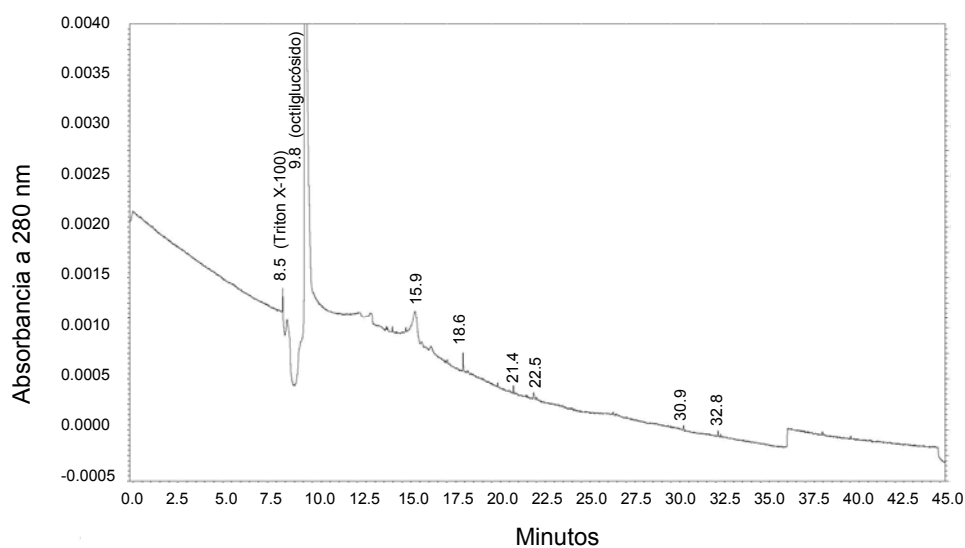


Figura 83. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM con detección a 280 nm.

Aún así se mantenía uno de los complejos clorofila-proteína presente en las algas control con tiempo de migración 18,6 min y $\mu_a = 4,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, además de dos complejos nuevos de movilidades electroforéticas $3,7 \times 10^{-4}$ y $3,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ (**Fig. 84**).

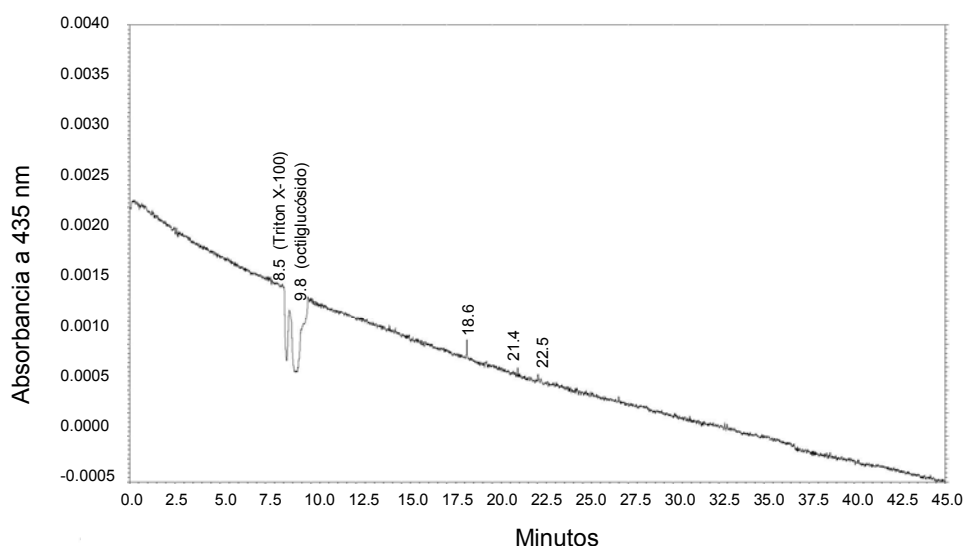


Figura 84. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM con detección a 435 nm.

Cuando las algas se pusieron en contacto con la lectina fúngica durante 2h, los complejos clorofila-proteína de las mismas experimentaron ciertos cambios con respecto a las algas control. Por un lado, desapareció el primer pico ($t_m = 12,9$ min y $\mu_a = 17,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$) cuando se medía la absorbancia a 435 nm (**Fig. 86**), pero se mantuvo a 280 nm (**Fig. 85**); y, por otro, aparecieron proteínas (picos detectados a 280 nm) con mayor número de cargas negativas y mayor peso molecular que las que aparecían en la muestra control, es decir, su tiempo de migración superaba los 20 min (**Fig. 85**). El único complejo clorofila-proteína detectado a 435 nm fue $\mu_a = 5,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ (17,8 min).

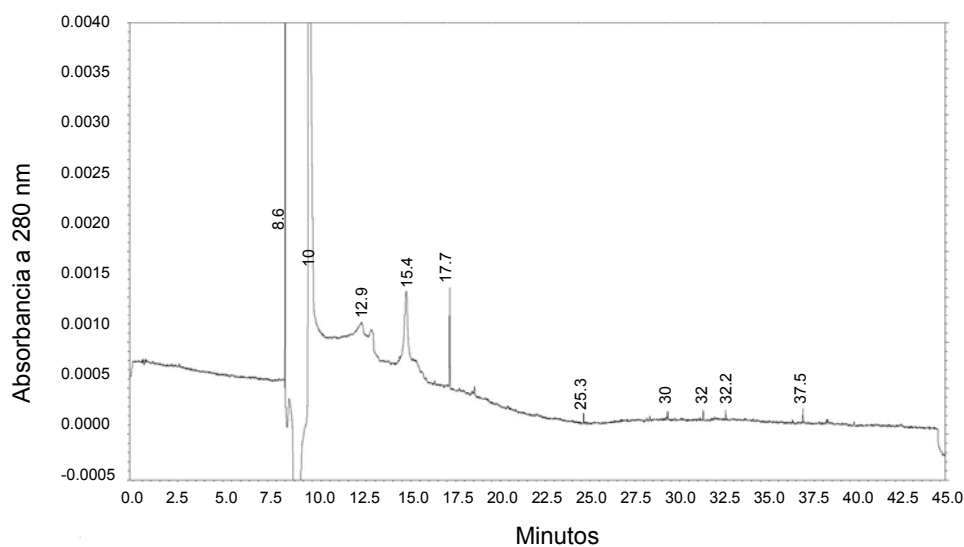


Figura 85. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en arginasa con detección a 280 nm.

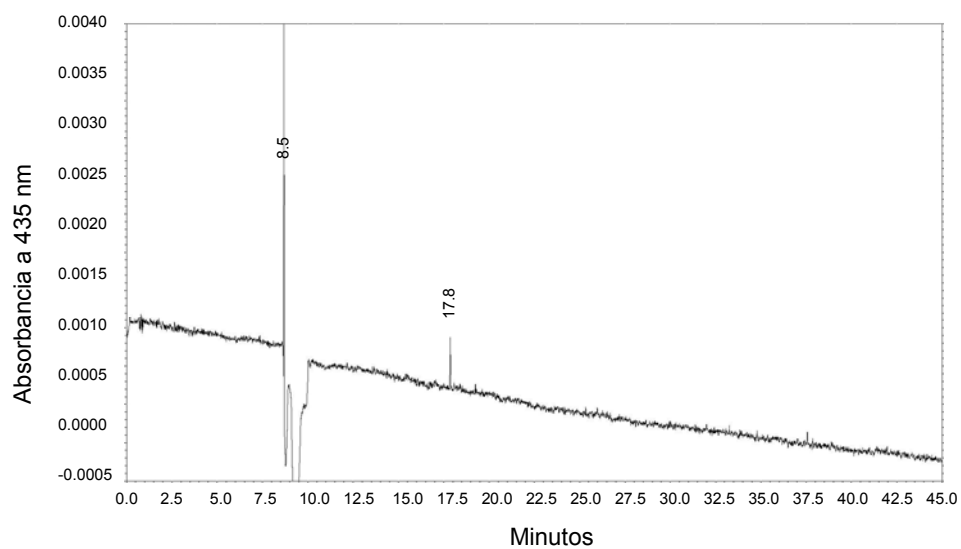


Figura 86. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en arginasa con detección a 435 nm.

Por tanto, estos dos últimos tratamientos se asemejan en dos sentidos: mantienen el complejo del control en torno a 18 min, y producen proteínas negativas de alto peso molecular a partir de los 20 min de la separación electroforética en adelante.

El aspecto más destacable en los electroferogramas de los complejos clorofila-proteína aislados de algas tratadas primero con urea y seguidamente con arginasa fue la aparición de una proteína catiónica, por resolverse anteriormente al componente neutro, correspondiente a un pico con $\mu_a = -13,45 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$. El hecho de que se detectara también a 435 nm indica la asociación con algún pigmento clorofílico (**Fig. 87 y 88**).

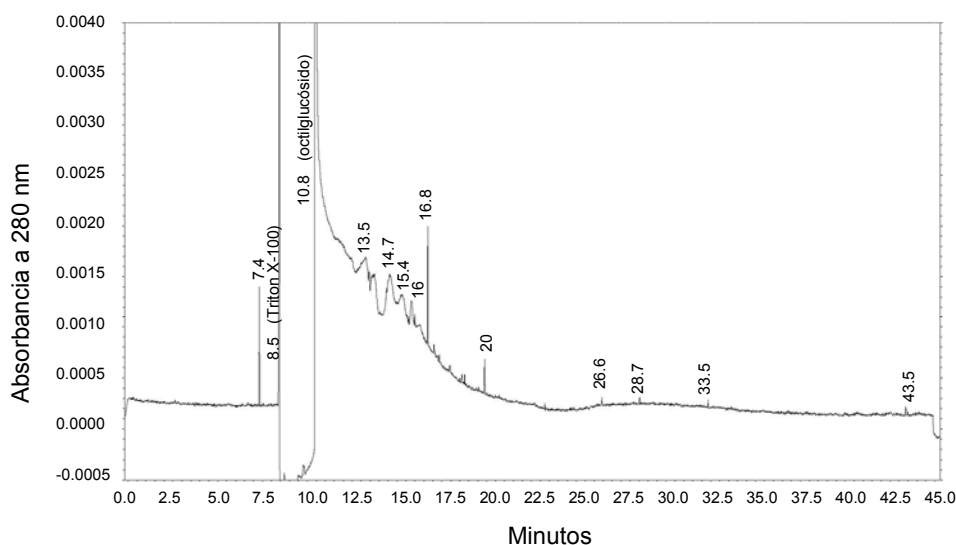


Figura 87. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM y después en arginasa fúngica con detección a 280 nm.

Además aparecieron otros dos complejos clorofila-proteína, de movilidades electroforéticas $6,9 \times 10^{-4}$ y $4,6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, éste último semejante al del control y el anterior fue un nuevo complejo resultado del efecto combinado de la urea y la arginasa, pero que estaba presente en los electroferogramas a 280 nm del control (**Fig. 77**) y en los tratamientos con putrescina (**Fig. 79-82**).

Se mantuvieron cinco proteínas (con μ_a $1,9 \times 10^{-4}$, $2,4 \times 10^{-4}$, $2,7 \times 10^{-4}$, 8×10^{-4} , $14,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$) (**Fig. 87**) que aparecían ya en la incubación con arginasa (**Fig. 85**). Y otras con movilidades electroforéticas $1,9 \times 10^{-4}$, $2,4 \times 10^{-4}$, $4,6 \times 10^{-4}$ y $6,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, que también estaban presentes en el tratamiento con urea (**Fig. 83**).

La diferencia entre este tratamiento y los dos anteriores es la aparición de abundantes proteínas en la zona próxima al componente neutro, es decir, como si las proteínas existentes en los otros tratamientos aparecieran aquí convertidas en sustancias proteicas de menor peso molecular.

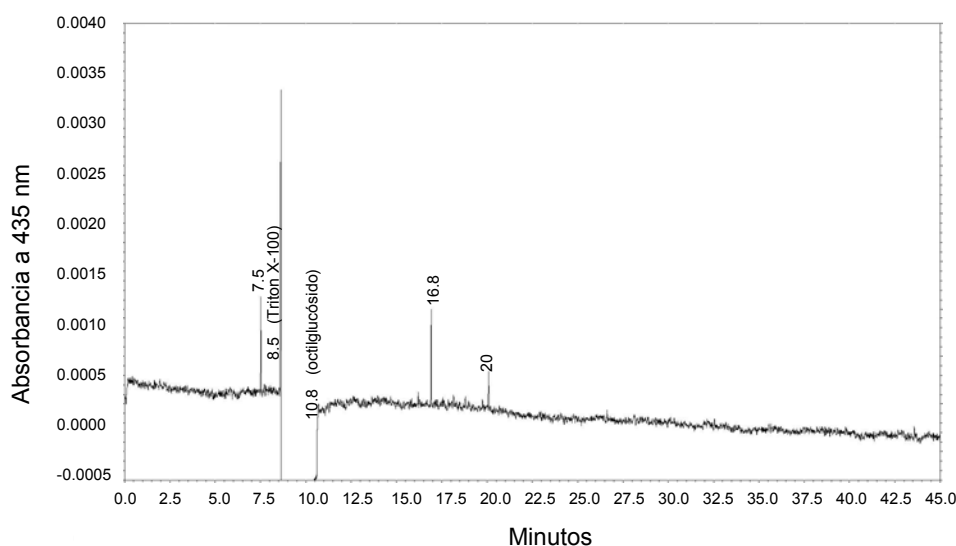


Figura 88. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM y después en arginasa fúngica con detección a 435 nm.

El perfil de picos observados en el último tratamiento (**Fig. 89 y 90**), una primera incubación con urea, después con α -galactosidasa y finalmente con arginasa, resultó parecerse al obtenido en la incubación con putrescina a una concentración de 7mM (**Fig. 82**) con cuatro complejos clorofila-proteína semejantes (de μ_a $6,5 \times 10^{-4}$, $7,6 \times 10^{-4}$, $7,9 \times 10^{-4}$ y $13,9 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$). Pero además se resolvieron cinco picos nuevos propios del tratamiento con la enzima α -galactosidasa debidos a la aparición de complejos de mayor carga negativa y peso molecular asociados, en su mayoría, a pigmentos clorofílicos.

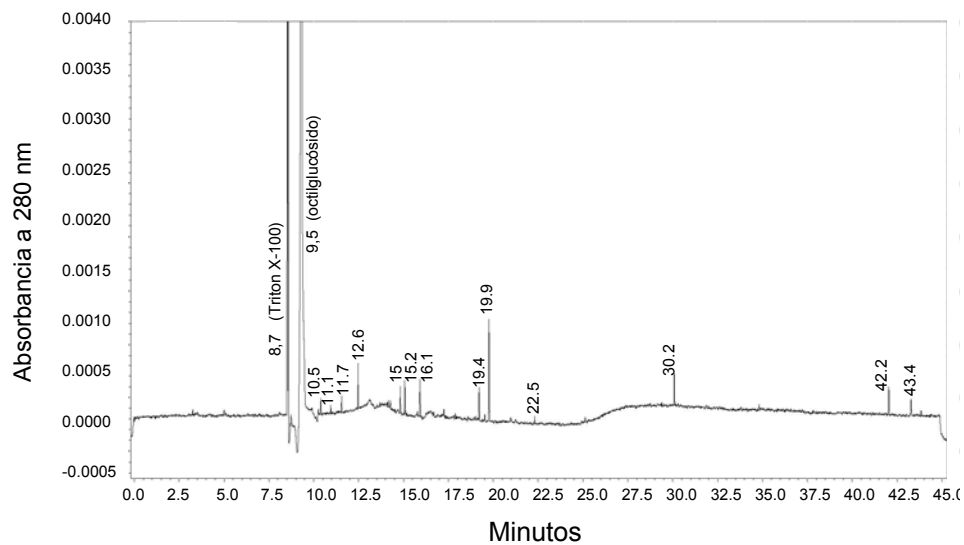


Figura 89. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM, α -galactosidasa (5u mL^{-1}) y arginasa con detección a 280 nm.

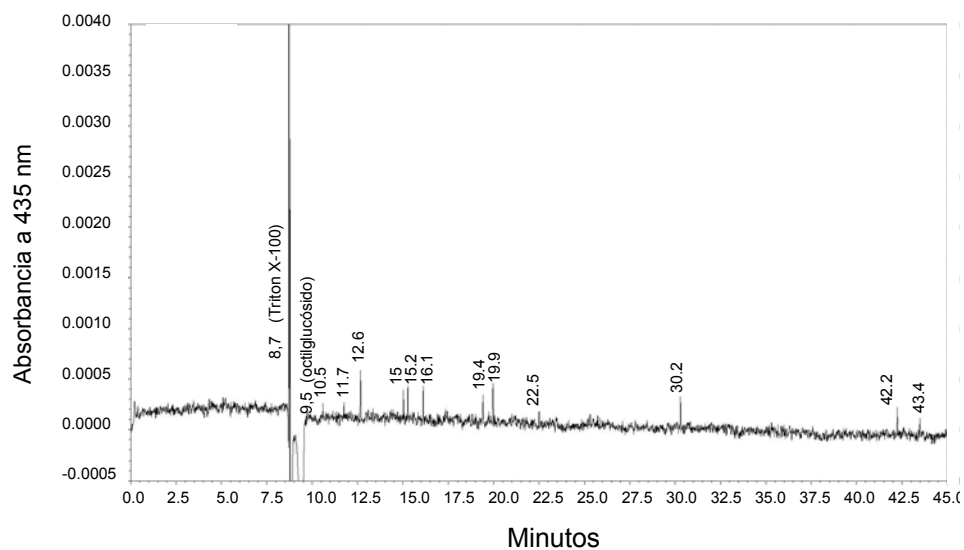
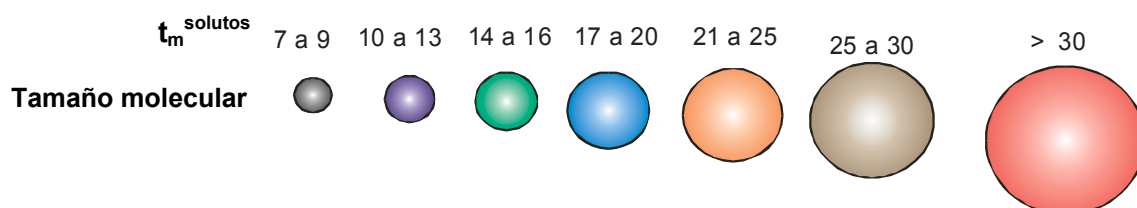
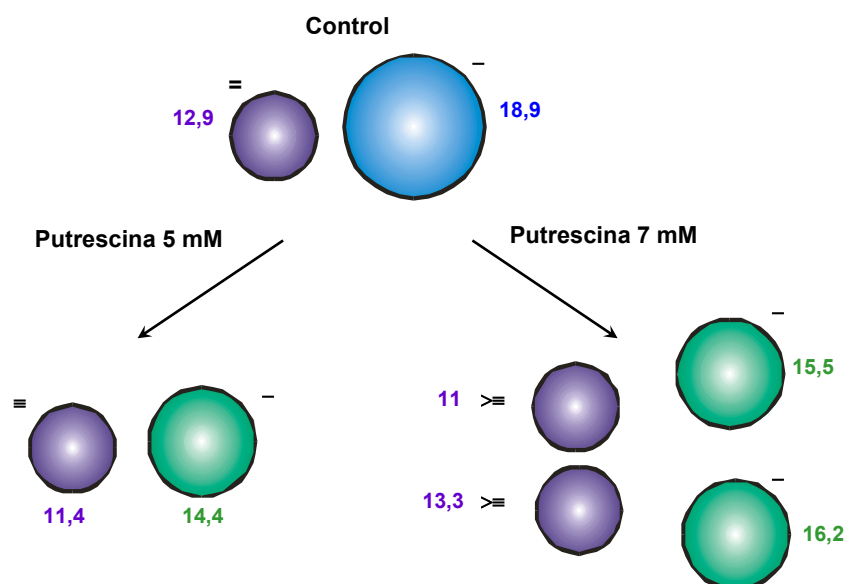


Figura 90. Electroferograma de complejos clorofila proteína extraídos de algas incubadas en urea 40 mM, α -galactosidasa (5u mL^{-1}) y arginasa con detección a 435 nm.

Los resultados obtenidos a partir de los electroferogramas de las **figuras 77 a 90** y plasmados en las **tablas XI y XII**, y están resumidos en el siguiente esquema en el que se representan los complejos clorofila-proteína de partida, grupo control, y los péptidos asociados a pigmentos derivados de cada tratamiento según su tamaño y carga eléctrica. El tiempo de migración (minutos) de los solutos en el capilar es indicativo del tamaño molecular y quedarían representados de la siguiente manera:



De tal forma que los complejos clorofila-proteína formados tras sendos tratamientos con putrescina 5 y 7 mM serían:



Los complejos clorofila-proteína obtenidos a partir de algas de *Evernia prunastri*

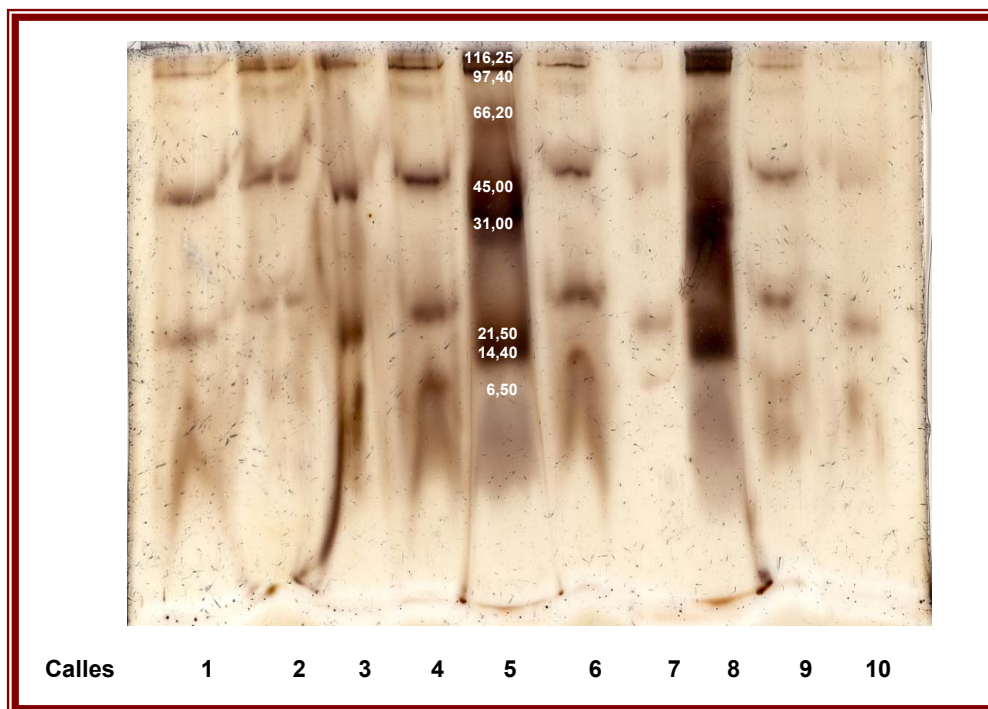


Figura 91. Gel de la electroforesis en poliácridamida-SDS de los complejos clorofila-proteína aislados de algas de *E. prunastri*. Calle 1: Complejos aislados de algas incubadas con urea 40 mM. Calle 2: Complejos de algas incubadas en arginasa talina. Calle 3: Complejos de algas tratadas con urea 40 mM y después con arginasa. Calle 4: Complejos de algas incubadas en urea 40 mM, α -galactosidasa y arginasa. Calle 5: Marcadores Moleculares (kDa). Calle 6: Complejos clorofila-proteína control. Calle 8: Marcadores Moleculares (kDa). Calle 9: Complejos aislados de algas incubadas en PUT 5 mM. Calle 10: Complejos aislados de algas incubadas en PUT 7 mM.

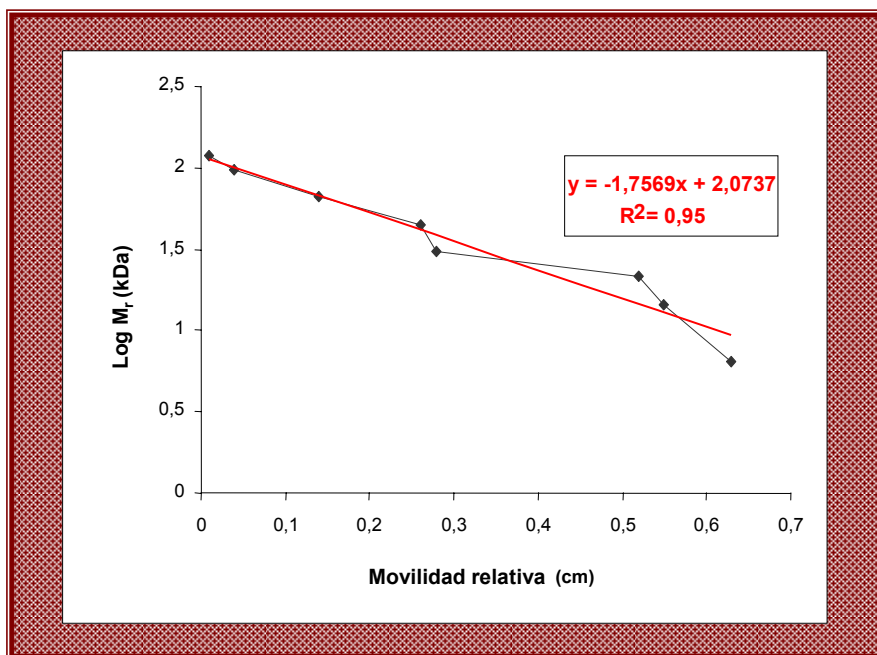


Figura 92. Representación gráfica del logaritmo de las masas moleculares de los patrones de proteínas utilizados en la PAGE-SDS, frente a la movilidad electroforética de las mismas en cm y ajuste de los puntos por regresión lineal.

En la muestra control se encontraron cinco bandas con pesos moleculares: 112,02 kDa, 101,53 kDa, 84,58 kDa, 48,23 kDa, 19,08 kDa y 12,52 kDa. La muestra incubada en urea mostró las tres primeras proteínas como las del control 112,02 kDa, 101,53 kDa, 84,58 kDa, y luego tenía tres más pequeñas de 40,74 kDa, 14,41 kDa, y 9,45 kDa. La incubación con arginasa presentaba las mismas proteínas que el control con la salvedad de que la más pequeña presentaba una banda muy débil, quizás por estar en menor concentración. Los complejos clorofila-proteína de las algas tratadas con urea, α -1,4-galactosidasa y arginasa presentaban el mismo patrón de bandas que los del control.

El efecto más significativo de la putrescina fue un menor revelado de las bandas, llegando incluso a desaparecer en la concentración de 7 mM.

9. COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA DE LA ARGINASA

Las secuencias de los péptidos de cada arginasa se obtuvieron mediante el programa DENOVO TOOL de Applied Biosystems. En el caso de la arginasa segregable de *E. prunastri* (SAE) se utilizó un péptido de 1224,62 Da. Para la arginasa de *X. parietina* (SAX) se utilizaron aquellos de masas 927,5 Da y 1478,78 Da.

9.1. Composición cuantitativa de los aminoácidos de SAE y SAX

Resultados previos (Legaz *et al.*, 2001; Molina y Vicente, 2000) indicaban algunas diferencias y similitudes entre SAE y SAX con respecto a su composición aminoacídica (**Tabla IX**), las cuales se detallan a continuación:

- Ambas proteínas contenían ácido aspártico o asparagina, cisteína y triptófano en una proporción similar.
- El contenido de alanina fue idéntico en ambas arginasas.
- Aunque la glicina y el ácido glutámico fueron los aminoácidos más abundantes en las dos arginasas, el valor porcentual de ambos aminoácidos fue mayor en SAX que en SAE.
- El menor contenido de valina se encontró en SAX.
- La arginasa de *Xanthoria* contenía menores cantidades de isoleucina, leucina y lisina y mayores cantidades de histidina que la arginasa de *Evernia*.

Tabla XIII. Composición cuantitativa de aminoácidos en mol mol⁻¹ de ambas arginasas, SAE y SAX según Legaz *et al.* (2001) y Molina y Vicente (2000), respectivamente.

Aminoácido	SAE	SAX
C (Cys)	0,8	1,13
D + N (Asx)	11,6	9,88
T (Thr)	6,0	3,56
S (Ser)	9,8	14,58
E + Q (Glx)	14,9	18,04
P (Pro)	4,8	7,41
G (Gly)	15,4	22,39
A (Ala)	8,4	7,13
V (Val)	5,6	2,72
M (Met)	1,0	0,17
I (Ile)	3,2	1,45
L (Leu)	5,6	2,1
Y (Tyr)	1,8	1,07
F (Phe)	2,3	0,34
H (His)	1,4	6,28
K (Lys)	4,6	2,87
R (Arg)	2,4	4,0
W (Trp)	1,2	1,02

9.2. Composición de azúcares de SAE y SAX

La mitad glicosilada de SAX contenía una cantidad equimolecular de D-galactosa y D-glucosa (Molina y Vicente, 1996), mientras que la de SAE contenía 280 residuos de glucosa, 85 de manosa y 27 de fructosa por molécula de proteína (Planelles y Legaz, 1987) (**Tabla X**)

Tabla XIV. Residuos monosacáridicos por molécula de las arginasas segregables purificadas a partir de talos de *E. prunastri* y *X. parietina*.

Monosacárido	SAE	SAX
Glucosa	280	8
Manosa	85	...
Fructosa	27	...
Galactosa	...	4

9.3. Fragmentos de la secuenciación de aminoácidos

La digestión con tripsina de las bandas individuales de las arginasas SAE y SAX a partir de la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (**Fig. 93**) produjo diferentes péptidos, cuya secuencia se analizó como se describe en el apartado 10.1.4. de Material y Métodos.

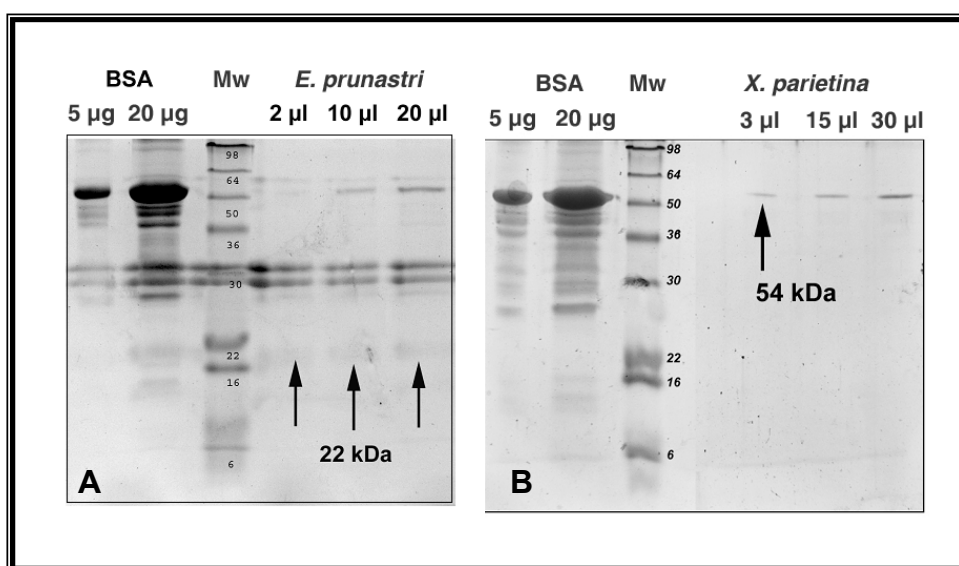
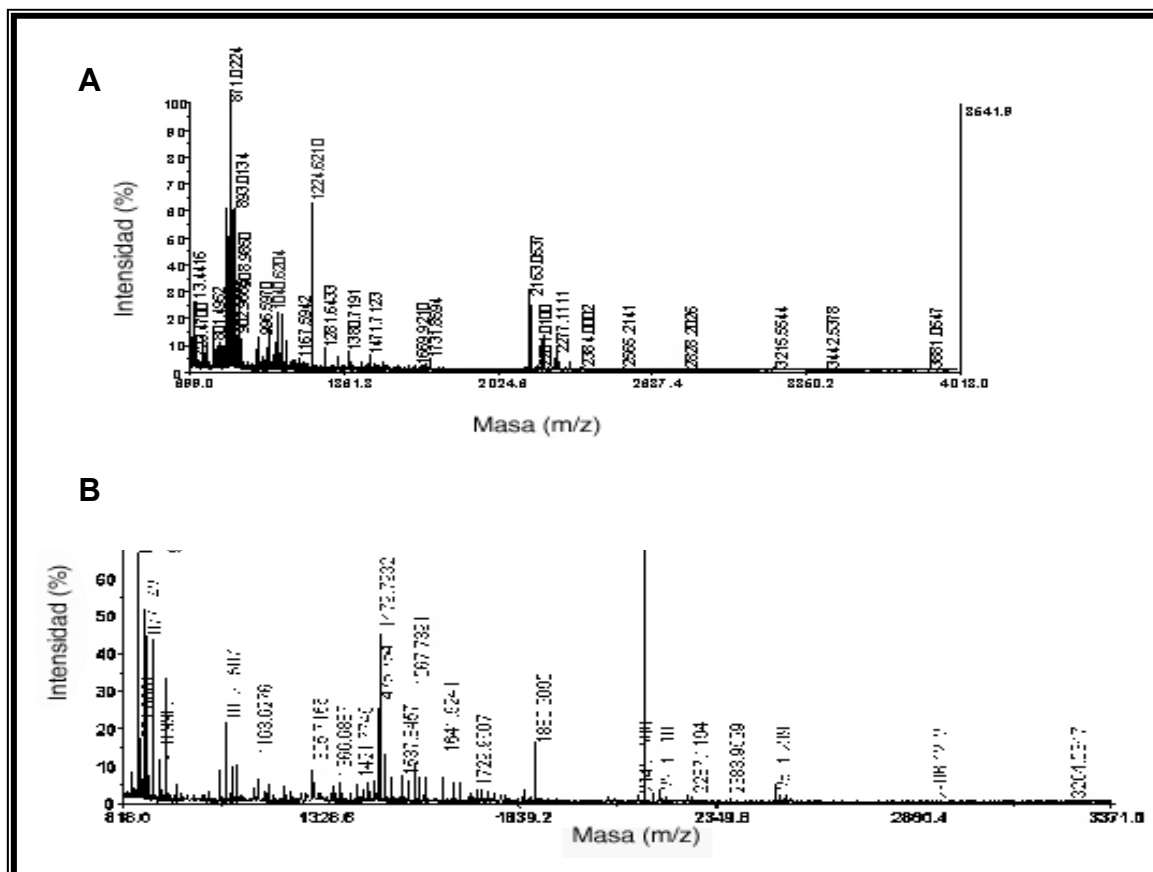


Figura 93. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de SAE (A) mostrando una banda de 22 kDa aproximadamente, y SAX (B) con otra banda sobre 54 kDa, previamente dializadas frente a tampón Tris-HCl pH 9,1. En paralelo a las muestras de arginasas, también se corrieron en los geles dos cantidades diferentes de albúmina de suero bovino (BSA) como control, así como la mezcla de marcadores moleculares (Mw).

La secuencia del fragmento de masa molecular 1224,62 Da, obtenido tras digerir la proteína SAE con tripsina, fue revelada como PPGGHNKAKYR (Pro-Pro-Gly-Gly-His-Asn-Lys-Ala-Lys-Tyr-Arg) (**Fig. 94A**).

La digestión de SAX dio lugar a dos péptidos diferentes. Uno de ellos con una masa molecular de 927,5 Da, cuya secuencia resultó ser YLYELAR (Tyr-Leu-Tyr-Glu-Leu-Ala-Arg) en MS-MS y el segundo fragmento, con una masa molecular de 1479,78 Da y una secuencia KNGLKFGTSTR (Lys-Asn-Gly-Leu-Lys-Phe-Gly-Thr-Ser-Thr-Arg) (**Fig. 94B**).

Las muestras de proteínas (700 pmol) fueron analizadas en un secuenciador de aminoácidos, pero una secuencia del extremo N-terminal no pudo determinarse posiblemente por la existencia de algún tipo de bloqueo en la molécula, probablemente debido a su glicosilación.



10. OLIGONUCLEÓTIDO DE ARGINASA

10.1 Primera PCR en gradiente de temperatura

La amplificación de los dos materiales genéticos ensayados por PCR con los cebadores diseñados a partir de secuencias conocidas de arginasas fúngicas en las condiciones y combinaciones indicadas en el apartado 10.2.2.2 de Material y Métodos se muestran en la **figura 95**.

Los cebadores en las combinaciones 2 y 4 (*Arg forward* 1-310 / *Arg reverse* 1-880 y *Arg forward* 2-310 / *Arg reverse* 1-880, respectivamente) se seleccionaron para descartar las otras dos combinaciones de cebadores puesto que no dieron lugar a productos puros de PCR, los cuales además resultaron ser de gran tamaño (> 1000 pb). Asimismo se descartó el material genético de *X. parietina* ya que no hubo hibridación por parte de los cebadores. Por otro lado, la temperatura de hibridación idónea rondaba los 54-55° C.

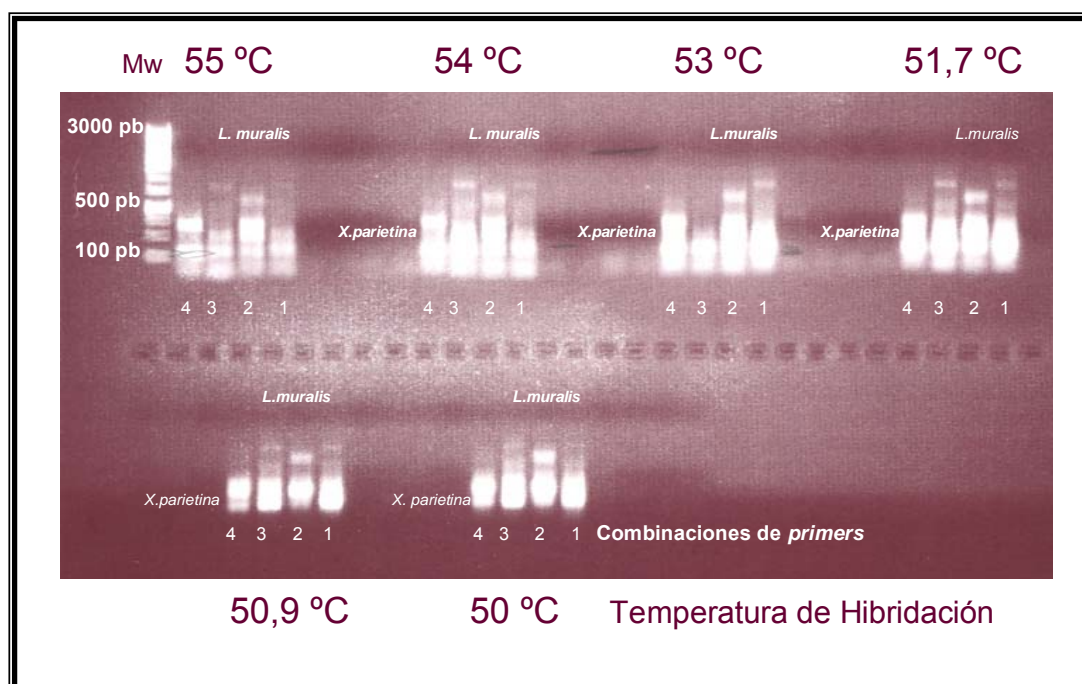


Figura 95. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR en gradiente de temperatura. Se representa en cada temperatura la amplificación de cada material genético, *L. muralis* en las 4 primeras calles y *X. parietina* en las 4 siguientes. Los números del 1 al 4 corresponden a cada una de las combinaciones de cebadores. Los productos de PCR más puros fueron aquellos cuya temperatura de hibridación fue 55° C ó 54° C, como se observa en las bandas teñidas de bromuro de etidio bajo la luz UV. Mw= Marcador molecular en pares de bases (pb).

Una segunda prueba fue realizada con otra polimerasa diferente (*Taq* DNA Polimerasa de Fermentas) descartando las combinaciones 1 y 3 de los cebadores, y el ADN de *Xanthoria*. En este caso las hibridaciones de los cebadores fueron más específicas dando lugar a productos de PCR más puros (**Fig. 96**). Concretamente, el producto de PCR obtenido con la combinación de cebadores *Arg forward* 1-310 / *Arg reverse* 1-880 y 50,9° C como temperatura de hibridación, fue el más limpio una vez visualizado el gel de agarosa. Por tanto, se clonó después según el protocolo explicado en el apartado 10.2.4. de Material y Métodos.

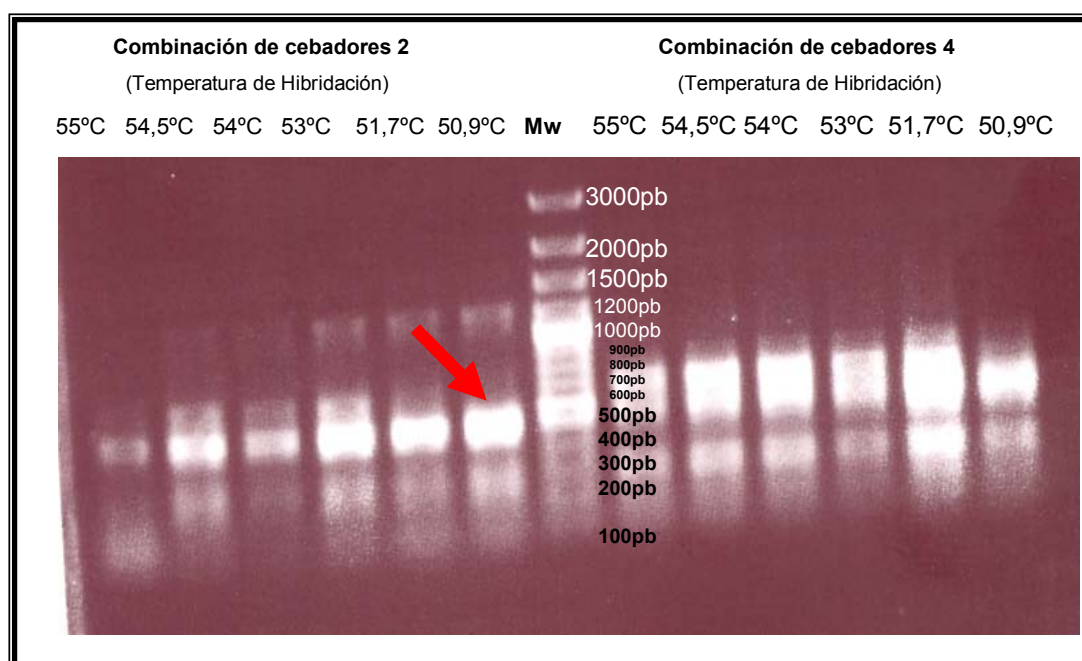


Figura 96. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR en gradiente de temperatura con el ADN de *L. muralis* como ADN molde y con las combinaciones de cebadores 2 y 4 (For1/ Rev1 y For2/ Rev1, respectivamente). La flecha roja indica el amplicón elegido para el clonaje en células competentes de *E. coli*. Mw= Marcador molecular en pares de bases (pb).

10.2.1. PCR del clonaje

El producto de la PCR anterior de 500 pb, aproximadamente, amplificado por los cebadores *For1/ Rev1* fue clonado en células *Escherichia coli* competentes vía el plásmido pCR® 4-TOPO®.

A las 24 h se obtuvieron multitud de colonias de las se seleccionaron aquellas completamente blancas (transformadas con el plásmido recombinante, es decir, con el fragmento de ADN de nuestro amplicón inserto en él, por tanto sin actividad β -galactosidasa pero resistentes al antibiótico). Estos clones se testaron en una nueva PCR utilizando los cebadores específicos del vector, M13 *forward* y M13 *reverse* (**Fig. 97**) y dos marcadores moleculares distintos de tal manera que se cubriera el rango entre 100 y 10000 pares de bases (**Fig. 98**).

Se obtuvieron varios grupos de productos con el mismo número de pares de bases. Los productos de las calles 1, 2, 3, 10, 11, 12, 13, 16 y 24 tenían un tamaño de aproximadamente 800 pb; los de las calles 4, 5, 23, 25, 33, 34, 42, 43, 44, 47 y 51 con 1200 pb; en las calles 41, 43, 46 y 49 los productos tenían 1500 pb; los de las calles 6, 7, 26 y 29 eran en torno a unas 500 pb; en las calles 32, 45, 50 fueron de 800 pb; y los de las calles 27 y 37 eran de 600 pb.

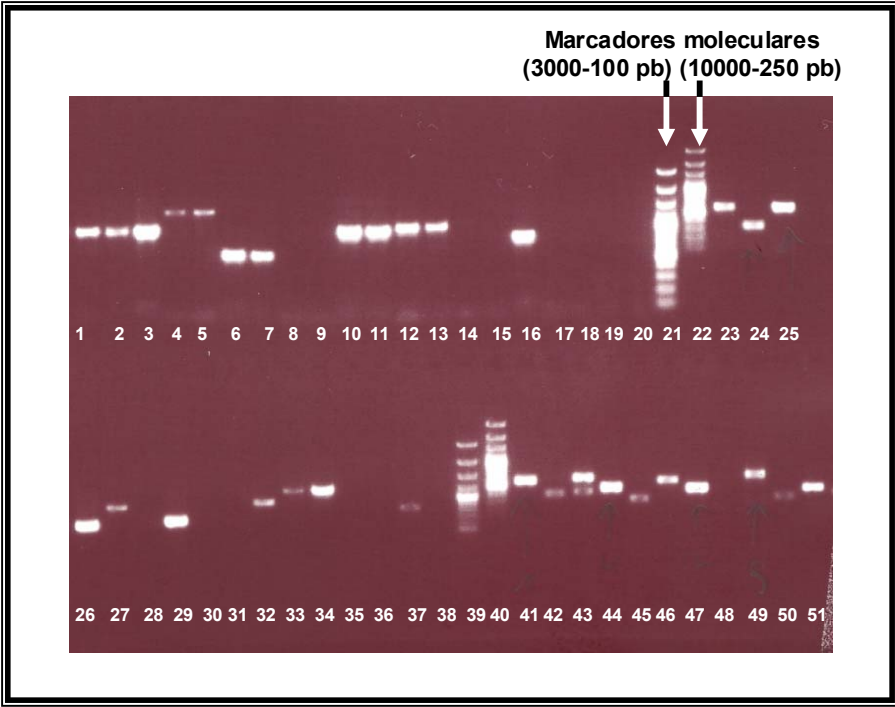


Figura 97. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR del clonaje. Las bandas pertenecen a los materiales genéticos amplificados por los cebadores M13 (*forward* y *reverse*) insertados en el plásmido con el que se transformaron las bacterias.

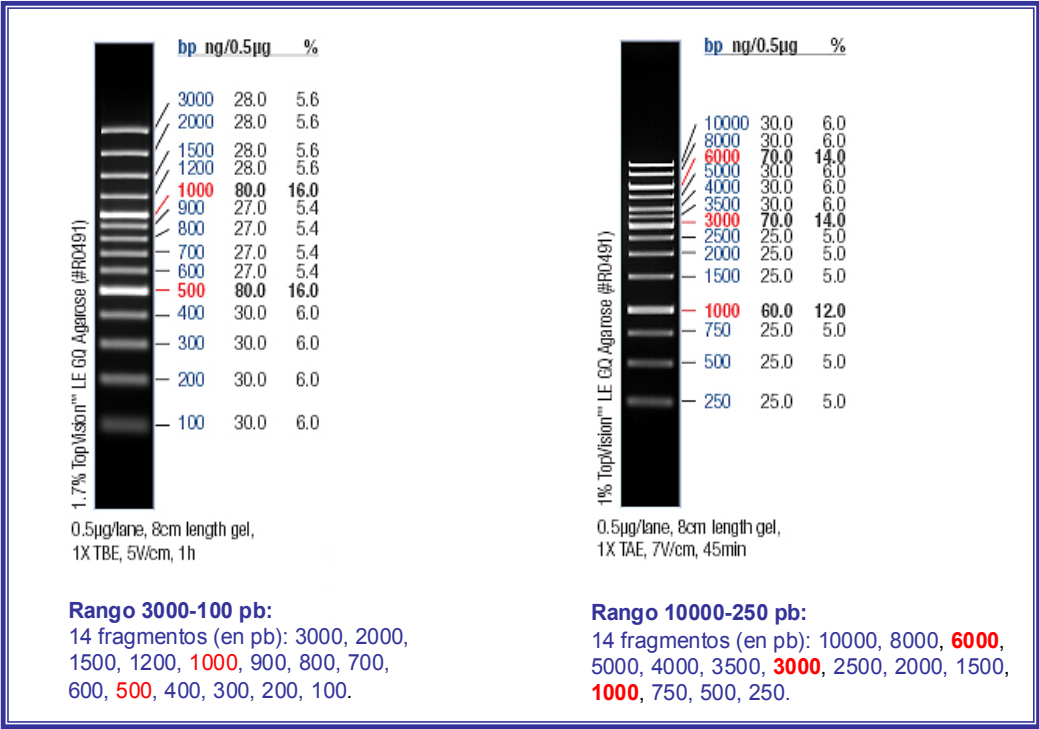


Figura 98. Marcadores moleculares utilizados en la electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de la PCR del clonaje. Las bandas señaladas en rojo son las que se encuentran más marcadas que el resto en los geles.

10.2.2. Similitud del oligonucleótido con las proteínas publicadas en la base de datos

Se seleccionó un clon de cada longitud dentro de un rango no superior a las 1000 pb y no inferior a las 600 pb. Se limpiaron de posibles contaminaciones de la mezcla de reacción y se enviaron al servicio de secuenciación MacroGen para después comparar con la base de datos NCBI (National Center Biotechnology Information) utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El alineamiento de secuencias fue significativo con las siguientes proteínas de la base de datos:

- Proteína bifuncional de *Oceanospirillum* sp. MED92 (Arahal *et al.*, 2007).

Similitud: 40 %.

Longitud: 484

Inserto problema: 367 GSVSILPIEDASGPPQQAIQRHRRSCQQGLADSLPLLLV ISADH 236
 G+ IL E + P A+ H G AD P+LLV+SADH
 88 GTDIILEPEGKNTAPTVALAAHHAQSNVGSADGEPILLVLSADH 131

- Proteína hipotética MG07073.4 de *Magnaporthe grisea* 70-15 (Dean *et al.*, 2005).

Similitud: 42 %.

Longitud: 363

Inserto problema: 358 SILPIEDASGPPQQAIQRHRRSCQQGLADSLPLLLVIS 245
 S+ P+ D++ P QQ +R +SC G SLPL+ V S
 50 SLQPLRDSARPQQQHARRFGKSCTMGALLSLPLMAVPS 87

10.3. Tercera PCR en gradiente de temperatura

Una tercera prueba fue realizada con la ADN Polimerasa GoTaq™ de Promega, utilizando todas las combinaciones posibles de cebadores (1. *Arg forward* 1-310 / *Arg reverse* 2-730, 2. *Arg forward* 1-310 / *Arg reverse* 1-880, 3. *Arg forward* 2-310 / *Arg reverse* 2-730, 4. *Arg forward* 2-310 / *Arg reverse* 1-880) y una PCR en gradiente de temperatura, utilizando el ADN aislado del componente fúngico de *X. parietina* como molde (**Fig. 99**).

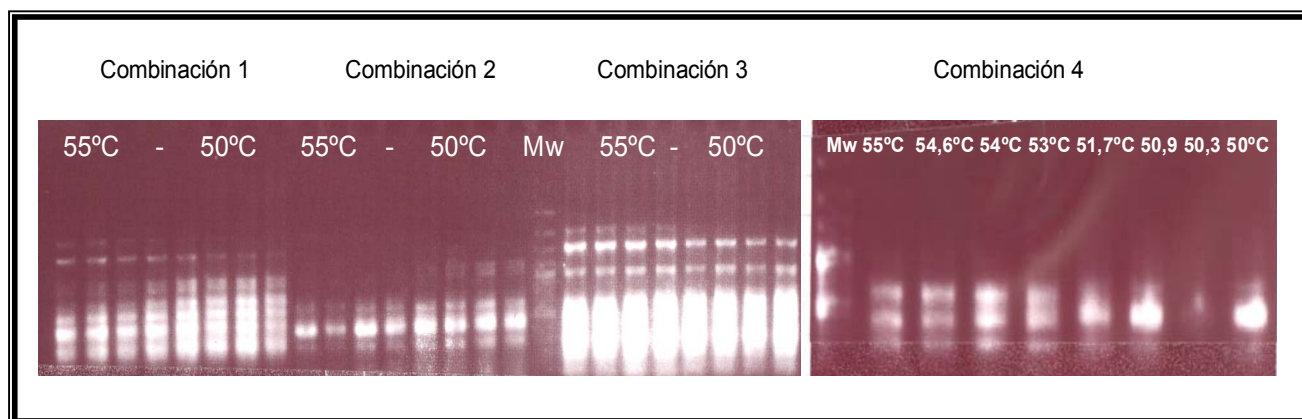


Figura 99. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR en gradiente de ocho temperaturas de hibridación (55° C, 54,6° C, 54° C, 53° C, 51,7° C, 50,9° C, 50,3° C y 50° C) realizada con las cuatro combinaciones de cebadores y la Go Taq ADN polimerasa. En la sucesión de temperaturas se observa cómo a mayor temperatura, la especificidad de unión de los cebadores al ADN molde es mayor, es decir, el número de bandas es menor. Mw= el Marcador molecular empleado en este caso fue GeneRuler™ y O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladders (100-3000 pb).

Las mejores combinaciones fueron la segunda (*For1* / *Rev1*) y la cuarta (*For2* / *Rev1*) por producir menos bandas, es decir amplificaron fragmentos de manera más específica que las otras combinaciones, y aún más específicas en la temperatura de hibridación de 54,6° C aproximadamente.

10.3.1. PCR del clonaje

Los productos de la PCR del gradiente obtenidos mediante la hibridación con las tres primeras combinaciones de cebadores a 54,6° C de temperatura de hibridación se clonaron como se realizó anteriormente. Las colonias blancas (transformadas con el plásmido e incapaces de metabolizar el X-gal por tener el gen Lac-Z interrumpido con nuestro amplicón) se seleccionaron y se amplificaron por PCR.

La PCR del clonaje (**Fig. 100**) dio lugar a productos de distintos tamaños: uno de 3000 pb en la calle 1, apenas concentrado, uno de 1700 pb en la calle 2, uno de 2000 pb en la calle 4, dos de 800 pb en las calles 6 y 9, respectivamente, dos de 700 pb en las calles 8 y 13, uno de 400 pb en la calle 11 y uno de 600 pb en la calle 14.

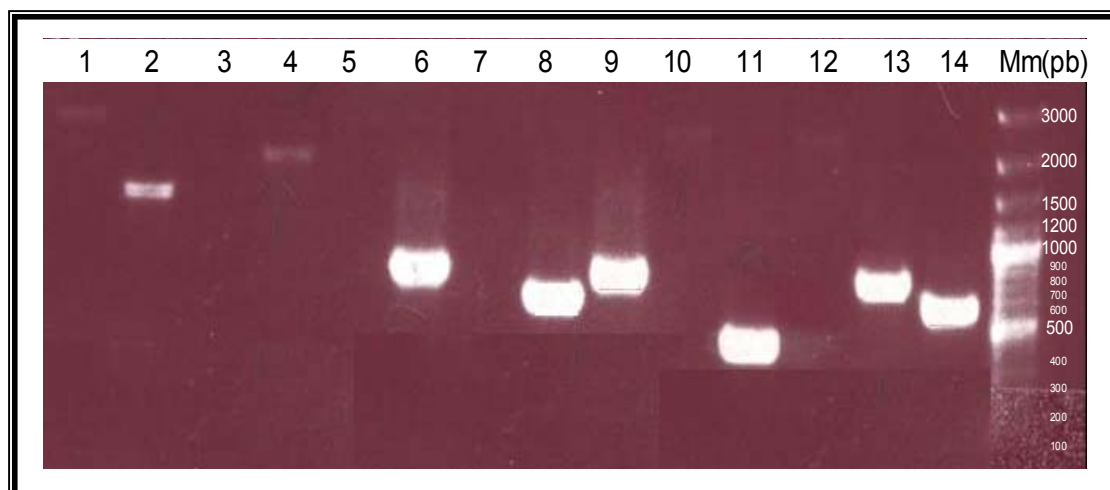


Figura 100. Electroforesis en gel de agarosa de la PCR del clonaje. Mw= Marcador molecular con un rango entre 100 y 3000 pb.

10.3.2. Similitud del oligonucleótido con las proteínas publicadas en la base de datos

La limpieza de los productos de la PCR del clonaje dio lugar a bandas más estrechas y de menor tamaño molecular, indicando que los oligonucleótidos quedaron libres de toda contaminación. Se obtuvieron dos insertos de 800 pb en las calles 3 y 4, respectivamente, uno de 1300 pb en la calle 1, uno de 1800 pb en la 2, uno de 2500 pb en la calle 5 y uno de 450 pb en la calle 6 (**Fig. 101**).

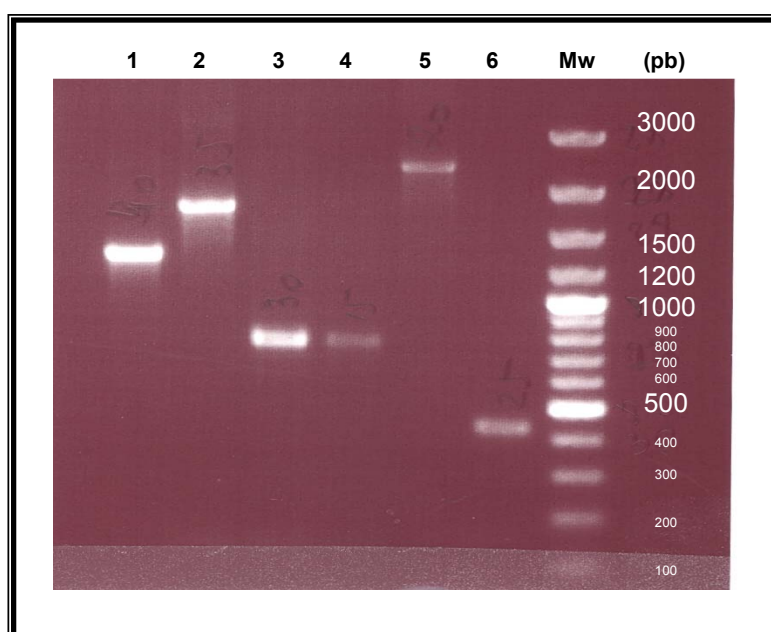


Figura 101. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR del clonaje tras haber sido sometidos al protocolo de limpieza de productos de PCR necesario su secuenciación. Mw= Marcador molecular con un rango entre 100 y 3000 pb.

Todos los productos se enviaron al servicio de secuenciación MacroGen, y mediante alineamiento de secuencias con la herramienta BLAST se obtuvo similitud en un solo caso:

- Subunidad pdxT de la glutamino amido-transferasa de *Aspergillus terreus* NIH2624 (Nierman *et al.*, 2005). Similitud: 79 %.

Longitud: 540

```

Inserto problema:  2  EHVQLLKQAAANLATETHASPKWEFIEVR
                   EH+QLLKQAAA +      H+  +W+FIEVR
                   283  EHIQLLKQAAAGWS - - - HSS-QWDFIEVR

                   TPQELDRCDALILPGGESTTISLVAARSNLL 181
                   TPQEL+RCDALILPGGESTT+SLVAARSNLL
                   TPQELERCDALILPGGESTTMSLVAARSNLL 338

Inserto problema: 182  EPLRDFVKVHRRPTWGTCAGLILLAESAN
                   EPLR+FVKVHR+PTWGTCAGLILLAESAN
                   339  EPLREFVKVHRKPTWGTCAGLILLAESAN

                   PDKEGWPRAYRRFRCAP*IGTTLV—VRPKV 355
                   K+G                      G  L+  +  +V
                   RTKKG - - - - - - - - - - GQELIGGLDVRV 384

Inserto problema: 356  SKRHW- - - - - - - - - - ICPFLNSCGKDQPPFPARFHSEP 439
                   ++ H+                      PFLN+ G+++ FPAF  P
                   385  NRNHFGQRQTESFQAPLELPFLNTPGQEEASFPAVFIRAP 423

```

DISCUSIÓN

1. PRODUCCIÓN SINCRÓNICA DE LA LECTINA FÚNGICA, EL RECEPTOR DE LA LECTINA EN EL CLOROBIONTE, Y LA DIVISIÓN CELULAR DEL ALGA EN *Evernia prunastri*

Los mecanismos de reconocimiento entre un clorobionte compatible y su compañero fúngico son absolutamente necesarios no sólo para la formación *de novo* de estas asociaciones, sino también para el mantenimiento del equilibrio en la simbiosis líquénica. Cuando las células de las algas se multiplican dentro de un talo en crecimiento, las células hijas son envueltas por las hifas fúngicas, las cuales deberían reconocer a las nuevas células como compañeras compatibles (Ahmadjian, 1993). Un alga es reconocida como un clorobionte compatible por un micobionte potencial cuando la lectina producida y segregada por el hongo es retenida en la superficie del alga, fuera de la célula, mediante un ligando para esa lectina en la pared celular del alga (Legaz *et al.*, 2004). Parece obvio que las algas de vida libre o las células hijas de nueva formación dentro de un talo deben ser capaces de producir este ligando para ser reconocidas como compatibles por un hongo de vida libre o por un micobionte de su propio talo.

Legaz y colaboradores (1986) encontraron que las enzimas inducibles arginasa y ureasa, sintetizadas y retenidas por el talo, se producen de acuerdo con las variaciones estacionales, la arginasa principalmente en primavera y verano, y la ureasa durante el otoño e invierno. En el presente trabajo se ha encontrado un comportamiento similar de la producción de las enzimas segregables, aunque la arginasa, mayoritariamente producida entre los meses de abril y agosto, puede sintetizarse y segregarse también durante el otoño a un nivel más bajo (**Fig. 32A**).

Dado que los talos líquénicos recogidos mensualmente se incubaron solo en tampón sin la adición de arginina o urea (inductores nutricionales de arginasa y ureasa, respectivamente), se deduce que tanto la producción como la secreción de ambas enzimas deben explicarse como una respuesta a las variaciones del contenido talino de los inductores, probablemente como una función de su disponibilidad por el sustrato. Entonces, la producción sincrónica de ambos, lectina y ligando, asegura el reconocimiento potencial de las nuevas algas dentro del talo como compañeras compatibles sólo si la división celular está sincronizada con la producción de las enzimas.

Un estudio en *Flavoparmelia caperata* mostró que durante el periodo comprendido entre julio y septiembre y entre enero y marzo, hubo pocas células en división de la población del clorobionte *Trebouxia* (Slocum *et al.*, 1980). Por otro lado, el número de células de *Trebouxia* de *Hypogymnia physodes* recogidas en enero fue 2,5 veces más alta que en junio y su tamaño medio fue pequeño mientras que desde marzo hasta el final de octubre, la mayoría de las células había alcanzado su mayor tamaño (Fiechter y Honegger, 1988). Czezuga y Krukowska (2001) encontraron diferencias estacionales parecidas para *Cetraria islandica*, *Cladonia arbuscula*, *Hypogymnia physodes*, *Parmelia sulcata* y *Peltigera rufescens*.

Los sistemas de percepción dependientes del fitocromo han sido descritos en varias especies líquénicas, incluyendo *Evernia prunastri* (Vicente, 1993). La morfogénesis del talo y algunos procesos metabólicos relacionados con la síntesis de compuestos secundarios pueden estar bajo el control por fitocromo, incluyendo la producción de AMP cíclico, aunque no estén localizados en las algas pero sí en el componente fúngico. Además, Giles (1970) demostró que la formación de aplanosporas en *Trebouxia erici* estaba regulada por el sistema fitocromo. Los resultados plasmados en las **figuras 33 y 34**, mostrando la existencia de aplanosporangios en los talos, así como una alta frecuencia de células pequeñas y jóvenes, bajo condiciones de día corto, pueden ser explicados en base a la medida de la longitud relativa del día por el fitocromo de las algas.

Los resultados obtenidos por Czezuga y Czezuga-Sumenik (2003) concernientes al efecto de la calidad de luz en el tamaño de las algas y la formación de los autosporangios están de acuerdo con los resultados del presente estudio. La producción de los aplanosporangios fue observada previamente en poblaciones aisladas de *Trebouxia* cultivadas a partir de *Xanthoria parietina* durante la fase de crecimiento activo (Molina *et al.*, 1997).

Aunque las condiciones de día corto son esenciales para producir células de alga de pequeño tamaño, las bajas temperaturas, naturalmente asociadas con los días cortos, cooperan en la formación de aplanosporangios y la liberación de células jóvenes dentro del talo (**Figuras 35C y D, y 38**). Los cambios ultraestructurales producidos por condiciones de frío están restringidos a una incipiente plasmolisis que produce células de alga de forma irregular, como se muestra en las **figuras 37 y 38**.

Por tanto, la producción del ligando para la lectina debe ser coincidente en el tiempo con la reproducción de las algas. En condiciones naturales, la síntesis de ureasa en *E. prunastri* está restringida al final del otoño y las primeras semanas del invierno. La producción máxima de ureasa es alcanzada en paralelo a la división de la algas y este hecho debe ser interpretado como un mecanismo que asegura la existencia del ligando de la lectina en la pared celular de las nuevas algas dentro de un talo para posibilitar su reconocimiento.

En cuanto a las preparaciones de Microscopía Electrónica, se utilizó acetona en lugar de etanol en la deshidratación de los cortes histológicos. El etanol extrae menos componentes celulares y sustancias líquénicas pero la acetona es utilizada como método estándar para extraer productos líquénicos (Culberson y Kristinsson, 1970). En ocasiones, se ha visto que el citrato de plomo (Reynolds, 1963) puede precipitar en presencia de sustancias líquénicas en disolución por su pH 12-13, de ahí la elección de la acetona para deshidratar. Se podrían haber utilizado otras tinciones indicadas para líquenes, como el acetato de uranilo (Dykstra, 1992), pero los resultados no son tan buenos como el citrato de plomo para cortes preparados en la resina Spurr (Spurr, 1969).

2. NATURALEZA DEL ENLACE GLICOSÍDICO DEL RECEPTOR DE PARED DEL ALGA PARA LA LECTINA FÚNGICA

Generalmente, la unión de la lectina a su ligando específico se mide mediante la utilización de una proteína marcada con un fluoróforo conocido, usualmente fluoresceína o fluorescamina, y la visualización posterior de la emisión de fluorescencia desde la superficie celular después de la unión. Muchas lectinas de plantas desarrollan actividades enzimáticas que no están relacionadas con su capacidad para unirse a su ligando, y estas actividades se pierden después de la unión. Esto mismo ha sido encontrado para las lectinas con actividad arginasa de *E. prunastri* (Legaz *et al.*, 2004) y *X. parietina* (Molina *et al.*, 1993). De esta manera, la pérdida de la correspondiente actividad enzimática puede ser vista como un descenso en la emisión de fluorescencia después de la unión. De hecho, la retención de la arginasa marcada con ITCF (Isotiocianato de Fluoresceína) por parte de los clorobiontes de *Evernia*, como se muestra en la **figura 40**, medida como descenso de

emisión de fluorescencia de la disolución después de la unión de la arginasa marcada, puede relacionarse con la pérdida de la actividad arginasa después de la unión a los mismos clorobiontes (**Fig. 39**).

Dado que la lectina se une a la mitad poligalactosilada de la ureasa de la pared celular (Legaz *et al.*, 2004; Pérez-Urria y Vicente, 1989), el tratamiento de los clorobiontes con enzimas de actividad α ó β -galactosidasa (que escinden el enlace glicosídico α - ó β -1,4- de los azúcares correspondientes) persigue relacionar la pérdida ocasional de la capacidad de unión de la lectina a la hidrólisis total o parcial del resto poligalactosilado del ligando.

Estas hidrolasas no sólo rompen el resto glicosídico de disacáridos como la lactosa o la melibiosa, sino también de tri- y tetrasacáridos como la rafinosa y la estaquiosa, todos ellos conteniendo galactosa. Los galactomananos, por ejemplo, liberan galactosa después de la incubación con la α -galactosidasa de tomate (Pressey, 1984), ya que las α -galactosidasas hidrolizan específicamente los residuos terminales no reductores de α -D-galactosa en los α -D-galactósidos. Además, la enzima β -galactosidasa cataliza la desgalactosilación de una glicoproteína aglutinina en cacahuete y libera galactosa a partir de galactosil-fetuina (Shibuya, 1999).

Por tanto, puede esperarse que la incubación de los clorobiontes de *Evernia* con α - ó β -galactosidasa produzca la desgalactosilación de algunas galactosil-proteínas de la superficie de la pared celular. Como se muestra en la **tabla V**, la enzima α -1,4-galactosidasa elimina tres veces más galactosa que la β -1,4-galactosidasa de los clorobiontes que contienen el ligando para la lectina de manera natural, es decir, de aquellos líquenes recolectados en invierno, y 1,5 veces más que aquellos que contienen el ligando inducido en condiciones de laboratorio, recolectados en primavera.

En paralelo a la pérdida de α -1,4-galactósidos de la superficie celular, la lectina no se une a su ligando específico (**Figs. 39 y 40**). El bajo nivel de emisión de fluorescencia observado en la **figura 40**, así como las imágenes **D** y **E** de la **figura 41** pueden explicarse si algunas moléculas de arginasa marcada con ITCF pasan al interior celular en ausencia del α -1,4-poligalactósido después de la hidrólisis, muy diferente de la intensa fluorescencia mostrada por las células con la lectina marcada adherida a la superficie celular (**Fig. 41B y C**).

En cualquier caso, la lectina penetra en las células en alguna medida incluso cuando sus paredes celulares contienen el ligando intacto (Molina *et al.*, 1998a). Este hecho puede ser debido a la existencia de un limitado número de sitios para el ligando en el alga que se satura con una baja cantidad de lectina marcada. De acuerdo con Legaz *et al.* (2004), otras proteínas minoritarias α -galactosiladas diferentes de la ureasa podrían actuar como ligando para la lectina después de la inducción de la ureasa en condiciones de laboratorio.

Esta hipótesis podría estar de acuerdo con los resultados mostrados en la **figura 39A**, pero, como se deduce de los resultados mostrados en la **figura 39B**, la ureasa sintetizada según la variación estacional es el único ligando para la arginasa fúngica, puesto que la unión de la lectina a las células de algas aisladas es completamente anulada mediante el tratamiento previo con α -1,4-galactosidasa. Por lo que se concluye que la ureasa glicosilada actúa como el principal (o único) ligando para la arginasa fúngica conteniendo un resto α -1,4-D-galactósido unido al polipéptido (Fig. 102).

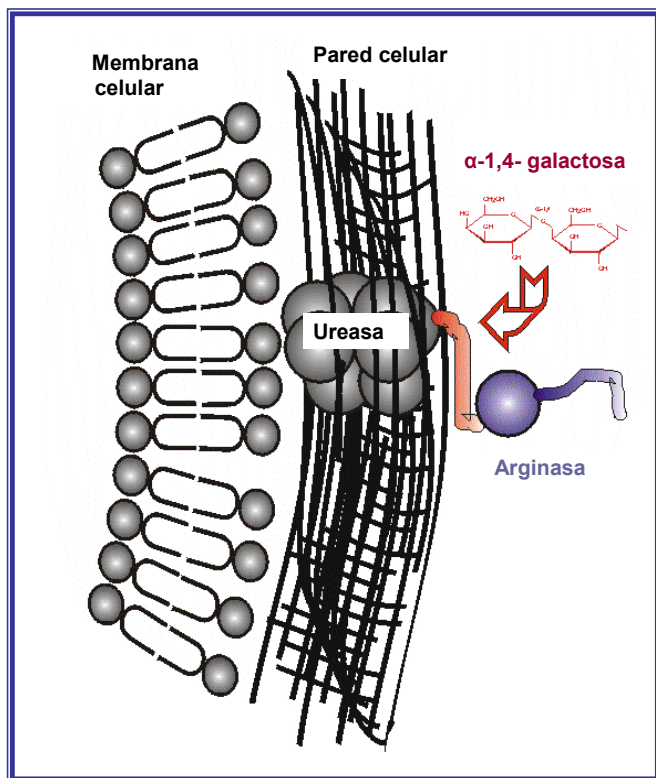


Figura 102. Esquema del reconocimiento lectina-ligando a nivel de la pared celular del alga. La parte peptídica de la arginasa fúngica reconoce el resto de azucarado de la ureasa de pared formado por restos de α -D-galactosa en uniones 1,4.

3. EL MODELO DE RECONOCIMIENTO CELULAR EN CLOROLÍQUENES A TRAVÉS DE UNA LECTINA FÚNGICA Y SU LIGANDO EN EL ALGA PUEDE EXTENDERSE A CIANOLÍQUENES

A partir de las similitudes encontradas en estudios estructurales y funcionales entre las lectinas de cianolíquenes y clorolíquenes, puede esperarse que el mecanismo de reconocimiento en clorolíquenes (Legaz *et al.*, 2004) se haga extensivo a cianolíquenes. De hecho, un cianoliquen como *Leptogium corniculatum* es capaz de inducir y segregar una arginasa glicosilada (**Fig. 42**) que se une a una ureasa poligalactosilada, purificada de un cloroliquen, previamente unida a un lecho agarosa activada (**Fig. 43**). No es sorprendente si se consulta el estudio de Marx y Peveling (1983), en el que se demostraba que los cianobiontes aislados de diferentes especies de cianolíquenes eran capaces de unirse a algunas lectinas de leguminosas, como la ricina A, siendo ésta específica de α - y β -D-galactosa. Entonces, la existencia de un receptor poligalactosilado para arginasas glicosiladas parece afectar a ambos cloro- y cianobiontes. Además, otros receptores pueden ser desarrollados por ambos fotobiontes dado que la concanavalina A, una lectina de *Cannavalia ensiformis* específica para α -D-glucosa y α -D-manosa también se une a algunos cianobiontes (Marx y Peveling, 1983) y clorobiontes (Fontaniella *et al.*, 2004).

La reactividad de los cianobiontes líquénicos frente a lectinas de leguminosas implica que las cianobacterias capaces de formar cianolíquenes poseen ligandos específicos de manosa en sus paredes celulares, cada uno de los cuales se comporta como una única proteína diferente de la ureasa previamente implicada en la unión dependiente de galactosa, y que estas proteínas no tienen actividad ureasa. Pero la actividad para unir ConA también ha sido descrita para los clorobiontes de *Evernia* y *Xanthoria* (Fontaniella *et al.*, 2004), indicando que la pared celular de estas algas contiene múltiples ligandos para diferentes lectinas.

Sin embargo, las especies de líquenes que contienen cianobacterias como fotobiontes específicos también desarrollan lectinas con afinidad por polisacáridos que contienen galactosa. Lehr y colaboradores (1995) purificaron una de estas lectinas de *Peltigera membranacea* así como cefalopodios de *Peltigera aphthosa* (Lehr *et al.*, 2000). Esta última fue una glicoproteína con una masa molecular de 20 kDa y una alta actividad citoaglutinante, la cual fue revertida mediante la adición de lactosa (β -D-glucosa-1,4- β -D-galactopiranosas) a la suspensión celular.

La fracción de proteína retenida por ureasa en lechos de agarosa ha sido caracterizada como una arginasa con una masa molecular de 33,5 kDa (**Fig. 44**) que se une preferentemente a la superficie celular de *Nostoc* aislado del talo de este mismo líquen (**Fig. 47**), pero también fue capaz de unirse, aunque en menor medida, a la superficie celular del clorobionte aislado de *E. prunastri* (**Fig. 48**). Esto implica que la asociación resultante entre un hongo que produce la lectina y un cianobionte o clorobionte poseedor de un receptor apropiado puede derivar en la formación de talos diferentes morfológica y funcionalmente.

Un fotobionte apropiado parece iniciar una cascada morfogenética dando lugar a un talo estratificado, seguida de una alteración en el patrón de expresión génica (Trembley *et al.*, 2002). Los mecanismos genéticos, primero de reconocimiento y luego de interacción, conducentes al desarrollo de talos complejos todavía tienen que ser dilucidados, aunque las proteínas que se unen a las algas (ABP, Algal Binding Proteins) y las lectinas deben estar implicadas (Bubrick y Galun, 1980, Bubrick *et al.*, 1985; Honegger, 2001). Además, la situación se complica cuando la misma parte fúngica de un talo puede formar estructuras morfológicas completamente diferentes dependiendo de si se asocia con cianobacterias o con algas verdes (Armaleo y Clerc, 1991).

Los antecedentes genéticos para la selección del fotobionte requieren estudios adicionales para fijar las relaciones taxonómicas de los patrones de selectividad. Sólo en algunos casos se ha encontrado una proteína de unión al clorobionte para mediar la elección del mismo (Bubrick y Galun, 1980, Bubrick *et al.*, 1985; Legaz *et al.*, 2004). Dos estrategias principales pueden ser las posibles conductoras de la evolución de los patrones de selectividad de simbioses. Una de selectividad más baja para linajes de simbioses, la cual puede incrementar la probabilidad de encontrar un compañero apropiado en hábitats variantes, mientras que otra de un nivel más alto de especificidad puede resultar en la optimización de la interacción simbiótica (Grube y Hawksworth, 2007).

La interacción arginasa-ureasa como base universal, no sólo para clorolíquenes, sino también para cianolíquenes puede hacerse válida tras el estudio realizado en *Leptogium corniculatum* y otros que se están desarrollando actualmente con diferentes especies de cianolíquenes. Se ha encontrado que la arginasa, segregada tras 2h de incubación del talo de *Leptogium* con arginina, es eficientemente

retenida en lechos de agarosa con ureasa galactosilada de *E. prunastri* previamente unida y completamente eluída del lecho usando galactosa (**Fig. 43**). Por tanto, la interacción entre la lectina de este cianoliquen y el ligando del cloroliquen justificaría el proceso de reconocimiento cuando el cianobionte fuera capaz de sintetizar la ureasa y retener una parte de esta enzima galactosilada en la pared celular.

4. ACCIÓN DE LA LECTINA FÚNGICA Y LA PUTRESCINA SOBRE LA ORGANIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS CLOROFILA-PROTEÍNA DEL CLOROBIONTE

Cuando la ureasa glicosilada no se encuentra en la pared celular del alga, la arginasa fúngica es internalizada, incrementando los niveles de putrescina, hecho que promueve la desorganización del cloroplasto, la activación de glucanasas y la rotura de la pared celular con la consiguiente pérdida del protoplasto (Molina y Vicente, 1995; Molina *et al.*, 1998a, 1998b).

Así, los valores obtenidos para la actividad fotosintética del fotosistema II en presencia de concentraciones crecientes de putrescina tienden a hacerse nulos al igual que la concentración de clorofilas de las algas de *E. prunastri* que fueron incubadas con la mayor concentración de la diamina (**Tabla VI**). En un experimento realizado por Cohen y colaboradores (1979), las actividades de los fotosistemas I y II de cloroplastos de discos de hoja de cebada tratados con poliaminas, decayeron más rápido que las del control.

Los espectros de absorción de los extractos clorofílicos de las algas tratadas con putrescina mostraron un decaimiento progresivo de absorbancia con respecto al control. Si bien el máximo en el azul de la clorofila *a* se mantuvo sin cambios significativos, no lo hizo en el rojo, donde la absorbancia llegó a disminuir en un 50 % aproximadamente (**Figuras 50 y 51**). Los máximos de la clorofila *b* (450 y 608 nm) fueron disminuyendo en la muestra tratada con putrescina 5 mM, mostrando un efecto más marcado en la de 7 mM.

La pérdida de clorofila, y por tanto, una aceleración de la senescencia, se ha observado también en hojas de monocotiledóneas que acumulan una cantidad masiva

de putrescina causada por estrés osmótico (Besford *et al.*, 1993). Por el contrario, los tratamientos de estas hojas con espermina y espermidina prevenían la pérdida de clorofila y preservaban las membranas tilacoidales en los sitios de los complejos clorofila-proteína. El mismo efecto estabilizador de membranas tilacoidales se ha atribuido a sustancias que hacen bajar el nivel de la diamina, como sucedía tras la adición de DAP (diaminopropano), espermina y/o espermidina para disminuir el valor de la razón PUT/ SPM + SPD (Tiburcio *et al.*, 1986), o bien tras la adición de un inhibidor específico de la síntesis de putrescina, DFMA (DL- α -difluorometilarginina) vía arginina descarboxilasa (Besford *et al.*, 1993).

Lee (1998) observó una correlación negativa entre los niveles de clorofila y tasa de crecimiento con la acumulación de putrescina en algunas especies de macroalgas marinas. La pérdida de clorofilas y la reducción del crecimiento fueron inhibidas por la adición de DFMA y DFMO (DL- α -difluorometilornitina), inhibidores específicos de las enzimas arginina y ornitina descarboxilasa, respectivamente. Se cree que, en luz, todas las poliaminas se encargan de promover más que de retardar la desaparición de clorofila (Kaur-Sawhney y Galston, 1979).

La emisión de fluorescencia de las clorofilas al ser excitadas por luz de 440 nm fue aumentando según se observa en los espectros de emisión (**Figs. 56-58**), de tal manera que el máximo encontrado a 750 nm fue casi tres veces superior en el caso de la incubación con putrescina 7 mM. Un efecto similar sólo fue obtenido en el tratamiento mixto de urea, α -galactosidasa y arginasa, lo que indica que sólo en estas circunstancias se produce suficiente cantidad de putrescina endógena. Los tratamientos con urea y arginasa (**Figs. 59 y 60**) sólo producen un ligero incremento en los máximos de emisión de fluorescencia respecto del control, siendo sumatorios en el tratamiento mixto de urea con arginasa (**Fig. 61**). Esto parece indicar que sólo en el caso reflejado en la **figura 62**, la ODC del alga colabora con la arginasa fúngica no detenida en la superficie celular por un receptor desprovisto de su resto glicosídico, en la formación de PUT.

El análisis de la fluorescencia depende del fenómeno consistente en que cuando un pigmento absorbe la energía de un fotón y entra en un estado electrónico excitado, haya esencialmente cuatro rutas de regreso al estado basal: 1) las reacciones fotoquímicas, en las que el electrón excitado abandona la molécula de pigmento y entra en una cadena de transporte de electrones, como ocurre en el caso

específico de las clorofilas en los centros de reacción fotosintéticos; 2) la liberación de calor; 3) la transferencia de la energía de excitación a un pigmento adyacente, como ocurre en los complejos antena de los organismos fotosintéticos; y 4) la emisión de un fotón, de una longitud de onda mayor que la del fotón absorbido inicialmente, lo que implica fluorescencia. Estos cuatro procesos están en competición en los sistemas biológicos. (Campell *et al.*, 1998).

Normalmente, la fluorescencia de las clorofilas tiene un rendimiento bajo, *in vivo*, debido sobre todo a la actividad del fotosistema II, y aunque es una vía minoritaria de disipación de la excitación, compite con las rutas más importantes cuantitativamente en cuanto a la liberación de energía fotoquímica del PSII, la transferencia de electrones al PSI y la disipación de calor (Campell *et al.*, 1998). Por ello, los cambios en los otros tres procesos causan cambios en la producción de fluorescencia de PSII (Krause y Weis, 1991; Bolhàr-Nordenkamp y Öquist, 1993). Cuando los potenciales de la disipación fotoquímica y no fotoquímica son mínimos, el rendimiento de fluorescencia es máximo (Campell *et al.*, 1998).

Por tanto, la bajada de actividad fotosintética observada en los extractos clorofílicos de las algas tratadas con putrescina coincide con un incremento en la señal de fluorescencia para los mismos extractos.

La excitación provocada por una λ entre 400 y 600 nm, medida como emisión a 680 nm, produjo una ligera bajada de los máximos inducidos por luces de 400, 476 y 500 nm, respectivamente, según aumentaba la concentración de putrescina puesta en contacto con las algas, y por el contrario, el pico producido por excitación a 537 nm cada vez fue más pronunciado (**Figs. 63-65**). Cuando la longitud de onda de emisión fue de 715 nm, se mantuvieron los máximos de excitación a 405 y 505 nm, aunque fueron menos prominentes a mayores concentraciones de putrescina. En estos últimos casos desapareció el máximo a 470 nm (**Figs. 70-72**).

En ambos casos, el efecto deletéreo de la putrescina es patente al disminuir la excitación pigmentaria. En principio, la señal experimental de fluorescencia emitida por los complejos antena de PSII depende primeramente de la densidad inicial de excitones dentro de los pigmentos de PSII, la cual es determinada por la distribución inicial de la energía absorbida entre PSI y PSII. Secundariamente, depende de las condiciones estructurales que afectan a la probabilidad de la transferencia de

excitación entre los pigmentos antena y desde estos a los centros de reacción de PSII (Krause y Weis, 1984).

La distribución de los estados excitados entre PSI y PSII está relacionada principalmente con la distribución lateral de los tres sistemas pigmentarios, PSI, PSII y LHCP dentro de la membrana tilacoidal y puede ser modulada por los fenómenos de fosforilación-defosforilación enzimática de LHCP (Bennett, 1979; Bennett *et al.*, 1980; Horton y Black, 1980; Allen *et al.*, 1981) o mediante variaciones en la concentración de cationes alrededor de la membrana (Barber, 1980). A pH fisiológico, las poliaminas putrescina, espermidina y espermina están protonadas con dos, tres y cuatro cargas positivas, respectivamente, lo que posibilita su unión a las cabezas de los grupos fosfolipídicos negativamente cargados o a otros sitios aniónicos de las membranas alterando su estabilidad y permeabilidad (Tiburcio *et al.*, 1993).

El análisis de los complejos clorofila-proteína, aislados de las algas incubadas en putrescina mediante electroforesis capilar, dan idea de una desorganización general de dichos complejos por la aparición de proteínas de menor tamaño (**Figs. 79 y 81, tablas XI y XII**) que las detectadas en el grupo control, así como asociaciones de pequeños péptidos a restos de pigmentos clorofílicos, resultado también de la acción de la putrescina, dado que absorbían a 435 nm (**Figs. 80 y 82**). Al pasar dichas muestras a través de un gel de poliacrilamida, las bandas eran indetectables ya en presencia de putrescina 7 mM, puesto que el nivel de sensibilidad de detección de este último método dista mucho del anterior al tratarse de nuevos compuestos con un tamaño considerablemente menor (**Fig. 91**).

La síntesis de pequeñas cantidades de putrescina en el alga es llevada a cabo por la acción secuencial de la arginina descarboxilasa y la agmatina amidino hidrolasa (Escribano y Legaz, 1988), pero la afinidad de la arginasa por la arginina es mucho mayor que la de la arginina descarboxilasa. Es sabido que tanto SAX como ABP, una vez en el interior celular, producen plasmolisis, empaquetamiento de los tilacoides, desarrollo de cuerpos de almacenamiento, además de un incremento en el número de vesículas de secreción de polisacáridos y cuerpos multivesiculares como un intento por parte del alga para enfrentar el ataque de glucanasas activadas por putrescina (Vicente *et al.*, 2008).

Por tanto, es de esperar que la acumulación de putrescina en el interior de las algas sea mayor en tanto en cuanto se posibilite la entrada de la lectina en las células, y una vez allí desencadenar todas las reacciones necesarias hasta llegar a una concentración de putrescina excesiva que ocasione daños patentes, al menos en el cloroplasto. Es decir, los fenómenos anteriormente observados para unas concentraciones de putrescina de 5 ó 7 mM no serán tan inminentes y fáciles de demostrar solamente por permitir en mayor o menor medida la entrada de la arginasa en las algas.

Si se comparan los resultados obtenidos en las actividades fotosintéticas de las algas tratadas con arginasa, urea y arginasa o urea, α -1,4-galactosidasa y arginasa, no se obtiene un decaimiento de actividad del P_{680} tan acusado como en los tratamientos con putrescina, aunque es cierto que cuando al romper el enlace glicosídico de la ureasa de pared con la α -1,4-galactosidasa se observó un descenso en la concentración de clorofilas similar al obtenido para el tratamiento de 7 mM (**Tabla VI**).

En cuanto a los espectros de absorción de las clorofilas de las algas incubadas en las condiciones anteriormente citadas, se encontraron unos efectos más marcados que en el análisis anterior. La sola incubación con urea disminuyó la absorción de la clorofila *a* en un 30 % para el máximo de 660 nm (**Fig. 52**). Este hecho podría sumarse al obtenido tras las incubaciones consecutivas en α -1,4-galactosidasa y en arginasa, puesto que la absorbancia en dicho máximo fue aún menor, más de un 50 % de pérdida (**Fig. 55**). El máximo en el azul, detectado en el resto de los espectros a 421 nm, debido quizá a las condiciones de extracción de las clorofilas con acetona, apareció aún más desplazado hacia la zona de menor longitud de onda del espectro. El máximo de clorofila *b* correspondiente a 450 nm apenas se distinguía solapándose casi completamente con el de la clorofila *a*, y el máximo en el rojo era casi imperceptible. Estos efectos son comparables a los encontrados en los tratamientos con putrescina.

El espectro de emisión de fluorescencia de la clorofila extraída de estas mismas algas (**Fig. 62**) fue similar al de aquellas tratadas con putrescina 7 mM (**Fig. 58**). Sin embargo, el tratamiento de las algas con urea (**Fig. 59**), o con arginasa solamente (**Fig. 60**), dio lugar a emisiones similares, con un máximo de fluorescencia ligeramente superior al control. La acción de la urea y arginasa juntas (**Fig. 61**) produjo

una situación comparable a la del tratamiento con putrescina 5 mM (**Fig. 57**), incrementando la emisión de fluorescencia indicando un descenso en las otras vías de desexcitación (Campell *et al.*, 1998).

Los espectros de excitación obtenidos para una longitud de onda de emisión de 680 nm en los tratamientos de urea (**Fig. 66**), urea y arginasa (**Fig. 68**), y urea, α -1,4-galactosidasa y arginasa (**Fig. 69**), también mostraron el máximo de excitación a 537 nm observado en el tratamiento con putrescina 5 y 7 mM (**Fig. 64 y 65**). El efecto tan marcado del espectro de excitación de fluorescencia a 715 nm de la putrescina 7 mM (**Fig. 72**) fue encontrado igualmente para las algas incubadas en urea, α -1,4-galactosidasa y arginasa (**Fig. 76**).

Los electroferogramas correspondientes a estos cuatro últimos tratamientos no fueron tan concluyentes como aquellos obtenidos para los tratamientos con concentraciones crecientes de putrescina. La alta sensibilidad del método arroja detalles nuevos en el análisis de los complejos clorofila-proteína. El hecho de que la incubación de las algas con urea y con arginasa por separado (**Figs. 83-86**) de lugar a la aparición de proteínas de mayor peso molecular que las encontradas en el control hace pensar que dichos tratamientos han causado la agregación de compuestos de naturaleza proteica sin efectos demasiado traumáticos, ya que se mantienen, además de la aparición de los nuevos, algunos complejos del grupo control. Este hecho podría implicar modificaciones postraduccionales de proteínas en términos de mecanismos típicos de polimerización y fosforilación, ya que la adquisición de mayor tamaño molecular y mayor concentración de carga negativa retrasaría la migración de los analitos. Es posible incluso que existiera una mayor exposición de aminoácidos con carga negativa en función del plegamiento que tuvieran las proteínas. Boekema y colaboradores (2001) observaron la formación de un complejo clorofila-proteína de gran tamaño inducido por una deficiencia en hierro en cianobacterias del género *Synechococcus*.

A la vista de que los nuevos picos no se ajustan al efecto ocasionado por la incubación con putrescina existen dos posibles razones: que la entrada de la arginasa en las células no haya llegado a desencadenar la síntesis de putrescina en las algas o incluso que la arginasa no haya penetrado en las células si hubiera sido frenada en el exterior. A la primera cuestión podríamos responder comprendiendo que la ornitina, junto con la urea formadas tras la actividad de la arginasa sobre la arginina, no haya

sido descarboxilada aún por la ornitina descarboxilasa, debido a que la mayoría de la actividad descarboxilasa, un 80 %, se encuentra en el micobionte y sólo una pequeña parte está particulada en el clorobionte (Escribano y Legaz, 1984).

El segundo planteamiento del impedimento por parte del alga a la entrada de la arginasa se basa en el estado fisiológico del liquen en el momento del estudio y en concreto, en la posibilidad de que el alga tenga distintos poros o proteínas de pared, como la ureasa poligalactosilada que retengan a la lectina fúngica en el exterior celular.

El efecto de la arginasa en células incubadas previamente en urea y α -1,4-galactosidasa ha sido muy similar al provocado con la incubación en putrescina 7 mM. El perfil electroforético en este caso también seguía los mismos pasos pero con el valor añadido del alto poder de detección de la electroforesis capilar, ya que la introducción de la galactosidasa en las incubaciones resulta en la aparición de nuevos complejos clorofila-proteína pero de mayor peso molecular y mayor cantidad de carga negativa que los aparecidos con urea y arginasa. Estos nuevos péptidos no fueron detectados por PAGE.

El aislamiento de los clorobiontes de los talos para el estudio de la estabilidad del cloroplasto ha sido esencial en el presente trabajo. Es necesaria para el análisis de ciertos procesos en esta relación simbiótica, como por ejemplo el transporte de hidratos de carbono desde el clorobionte al micobionte (Richardson *et al.*, 1968), la fijación de nitrógeno por cianobiontes y el reparto de compuestos nitrogenados de nueva síntesis (Millibank, 1972), la distribución de enzimas liquénicas entre ambos simbiontes (Legaz y Vicente, 1981), el cultivo axénico de los biontes y la resíntesis liquénica (Ahmadjian, 1993), y el papel de las lectinas liquénicas en el reconocimiento de clorobiontes compatibles (Galun, 1991; Molina *et al.*, 1993). Existen otros métodos para aislar algas liquenizadas como el método de la micropipeta (Ahmadjian, 1973), muy conveniente para el cultivo axénico de clorobiontes pero demasiado tedioso para los análisis bioquímicos y fisiológicos para los que se necesita una masa considerable de algas (Legaz y Vicente, 1981).

El método de Fontaniella y colaboradores (2000), utilizado aquí, proporciona la separación de ambos biontes manteniendo su integridad, pues no se observaron daños estructurales en ningún caso (**Fig. 20**). Dicha separación está basada en la retención de las células algales en la interfase acuosa del tampón fosfato y la solución

de sacarosa, mientras que las hifas quedan concentradas entre las disoluciones de sacarosa y KI. Las algas se pueden recoger fácilmente y aislarlas completamente de las hifas mediante sucesivas centrifugaciones en el mismo gradiente. Sin embargo, el rendimiento en cuanto a la cantidad de clorobiontes aislados obtenidos es pequeño debido a que estos constituyen una proporción del 7 % del talo liquénico (Coutiño y Montañez, 2000), lo que supone un inconveniente a la hora del aislamiento de componentes celulares como puedan ser los complejos clorofila-proteína.

En resumen, la lectina fúngica proporciona dos consecuencias dependiendo de la disponibilidad del receptor en la pared celular. Si las algas compatibles expresan un ligando de pared específico, la lectina quedará retenida en la pared, previniendo su penetración al citoplasma celular. En este caso el nivel de putrescina en las algas no aumenta debido a la ausencia de la actividad arginasa fúngica y el mantenimiento de los niveles de putrescina endógena no induce cambios significativos en las células del clorobionte (**Fig. 103**).

Reconocimiento y compatibilidad celular

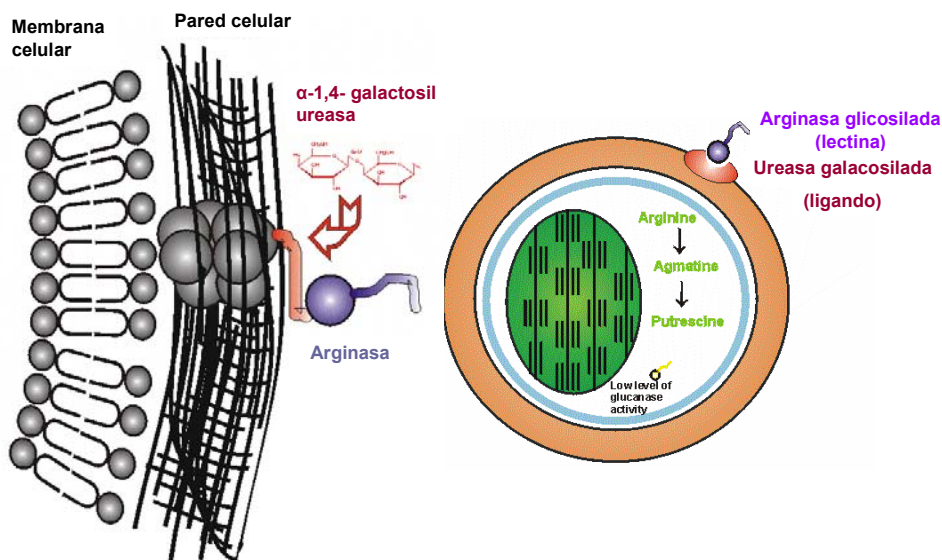


Figura 103. Reconocimiento de la lectina fúngica con actividad arginasa del clorobionte compatible. La lectina es retenida en la superficie de la pared celular mediante una reacción de afinidad entre la glicoproteína y su ligando de pared, una ureasa poligalactosilada sintetizada por los clorobiontes compatibles. La concentración de putrescina en el alga permanece sin cambios al igual que el cloroplasto y la pared celular.

Por otro lado, cuando la pared celular carece del receptor, la lectina penetra y produce un deterioro en las algas (**Fig. 104**). La muerte de las algas discriminadas ha sido definida como incompatibilidad.

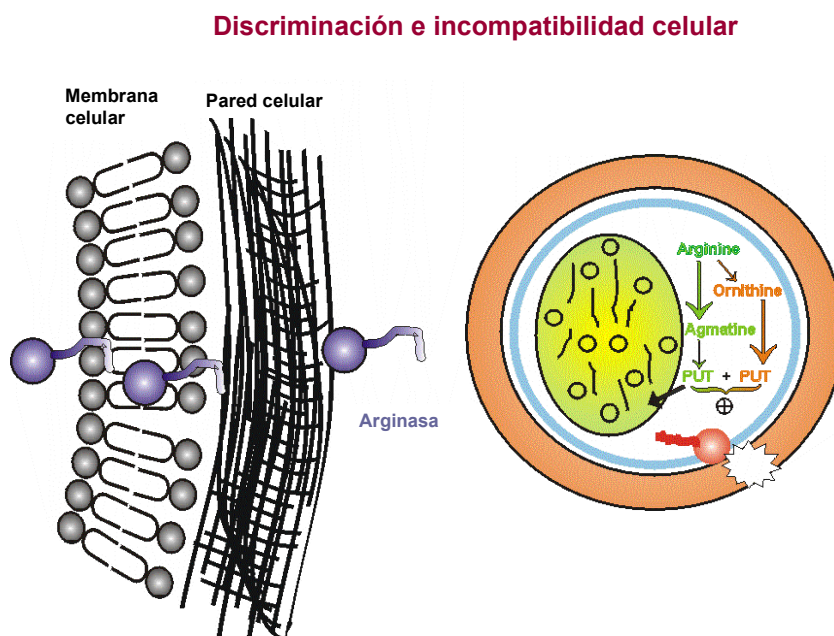


Figura 104. Discriminación de algas incompatibles mediante una lectina fúngica con actividad arginasa. La ausencia del receptor específico adecuado (ligando) sobre la pared celular facilita la entrada de la lectina en la célula, provocando un aumento en la concentración de putrescina, la cual desorganiza el cloroplasto y activa glucanasas que hidrolizan la pared celular y liberan el protoplasto del alga.

5. SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LECTINAS LIQUÉNICAS

En cuanto a la secuencia aminoacídica obtenida para las arginasas de *Evernia* y *Xanthoria*, se han encontrado algunas homologías con las arginasas de otras especies vegetales. Así, en el undecapéptido obtenido para SAE de 1124,62 Da (**Fig. 94A**), se encuentra el tripéptido PPG, también presente en arginasas de *Arabidopsis thaliana* (Perozich *et al.*, 1998), *Schizosaccharomyces pombe* (Van Huffel *et al.*, 1994) y *Pinus taeda* (Todd y Gifford, 2003), mientras que GHN estaba repetido en arginasas procedentes de *A. thaliana* y *Glycine max*, KAK en las de *Saccharomyces cerevisiae* (Kawamoto *et al.*, 1987), y GGH en las de *P. taeda*.

El tripéptido ELA, comprendido en el heptapéptido de 927,5 Da de masa molecular de la proteína SAX (**Fig. 94B**), está repetido en las secuencias de *A. thaliana*, *S. pombe* y *G. max*. Los tripéptidos TST y KFG del segundo péptido de SAX, de 1479,78 Da de masa molecular, obtenido mediante digestión triptica, se encuentran en las arginasas de *G. max*, y KNG está repetido en la arginasa de *Agaricus bisporus* (Wagemaker *et al.*, 2005). Sin embargo, no se encontraron homologías entre SAE y SAX con la arginasa de *Neurospora crassa* (Marathe *et al.*, 1998).

Se ha propuesto que el resto His141 de la arginasa de hígado de rata se une directamente a arginina, actuando como una bomba catalítica de protones (Canales *et al.*, 2001). Glu277 también está implicado en la unión a arginina, lo cual implica una correcta orientación del sustrato para el ataque nucleofílico de los puentes agua-Mn²⁺-proteína (Kanyo *et al.*, 1996). Una conformación muy similar puede encontrarse en el centro activo para la arginasa de levadura (Sumrada y Cooper, 1984) y de soja (Goldraij *et al.*, 1998). En la arginasa de soja, el tripéptido Gly-His-Asn, que contiene el resto activo de His para la asociación del sustrato, está claramente repetido en el undecapéptido obtenido para SAE.

Sin embargo, el resto Tyr encontrado en el heptapéptido obtenido para SAX no tenía ninguna equivalencia con el resto Tyr implicado en el sitio de unión al Ca²⁺, requerido para desarrollar actividad lectina de las arginasas segregables en el reconocimiento de los fotobiontes compatibles (Legaz *et al.*, 2004). En la lectina ConA de leguminosas se requiere un motivo Tyr100, Asp208 y Arg228 para unir Ca²⁺ (Shoham *et al.*, 1979) y es repetido en Tyr173, Asp280 y Arg301 para la arginasa de soja (Goldraij *et al.*, 1998). Curiosamente, la ConA también se une a ligandos que contienen manosa en la pared celular de los fotobiontes liquénicos (Fontaniella *et al.*, 2004).

El presente trabajo ha sido un primer intento para elucidar la secuencia de aminoácidos de las lectinas de ambos líquenes, con lo que se ha conseguido la identificación de ciertos motivos aminoacídicos claves en el reconocimiento por el sustrato, la arginina, y la unión a su cofactor metálico Mn²⁺.

6. CONSTRUCCIÓN DE UN OLIGONUCLEÓTIDO MODELO DE ARGINASA

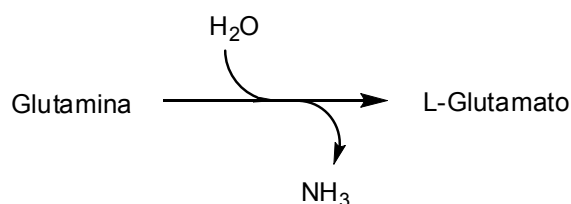
La experimentación realizada para la construcción de un oligonucleótido que sirviera como modelo de una lectina con actividad arginasa dio lugar a varias secuencias, entre ellas, una con un 79 % de homología con una proteína de *Aspergillus terreus* con actividad glutamino amido-transferasa. Las glutamino amidotransferasas son una familia de enzimas que utilizan el grupo amida de la glutamina en la biosíntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas de nucleótidos, coenzimas y aminoazúcares. Todas estas enzimas tienen una doble especificidad de sustrato: NH_3 puede reemplazar a la glutamina cuando se ensaya *in vitro* (Mäntsälä y Zalkin, 1984).

Según la base de datos consultada, **BRENDA**, la enzima cataliza la siguiente reacción:



aunque también pueden utilizar como sustratos corismato para producir antranilato, bicarbonato para producir carbamil-P, UTP para producir CTP, formilglicinamida ribonucleótido (FGAR) para producir formilglicinamidina ribonucleótido (FGAM), XMP para producir GMP, N^1 -(5'-fosforibosil)-formimino-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (PRFAR) para producir IGP, L-aspartato para producir L-asparagina, actividades comprendidas en la clase I de glutamina amido transferasas, y también fructosa-6-P para producir glucosamina-6-P, 2-oxoglutarato para producir L-glutamato o 5-fosforibosil-(α)1-pirofosfato para producir 5-fosforibosil-(β)1-amina, actividades comprendidas en la clase II de glutamina amido transferasas (Massière y Badet-Denisot, 1998).

Las GATasas (Glutamino Amidotransferasas) catalizan dos reacciones por separado mediante dos sitios activos, los cuales, están localizados en una sola cadena polipeptídica o en diferentes subunidades. La glutamina resulta hidrolizada a glutamato y amoniaco, el cual es añadido a un sustrato aceptor en una reacción de síntesis. Las GATasas son capaces de hidrolizar glutamina en ausencia de un sustrato aceptor del amonio, lo que implica una actividad glutaminasa (Zalkin, 1993):



El dominio que contiene el sitio para la glutamina ha sido llamado dominio GAT (dominio para la transferencia del grupo amido de la glutamina) y posee actividad glutaminasa. El dominio que contiene el sitio para el aceptor ha sido llamado dominio sintasa (o sintetasa) y es capaz de catalizar la reacción de transferencia dependiente de amonio. El dominio GAT posee un alto grado de homología con otros dominios de proteínas de ambas familias GATasas. Aunque los dominios GAT y sintasa puedan ser distinguidos con precisión en la secuencia primaria de las diferentes proteínas, su posición estérica es altamente variable (**Fig. 105**).

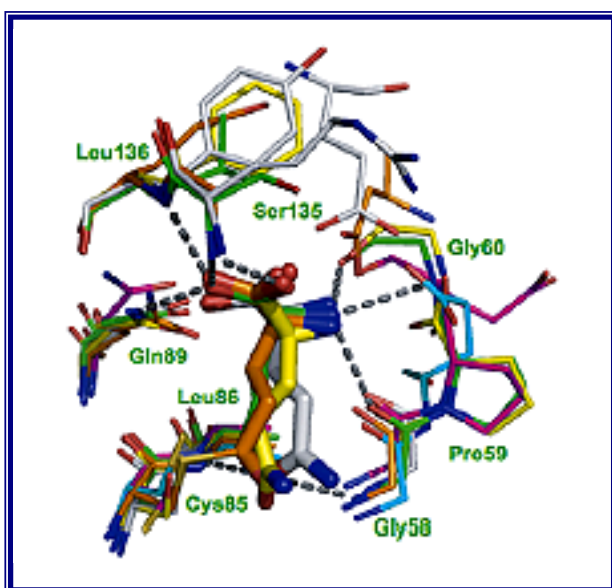


Figura 105. Residuos conservados del sitio GAT de varias GATasas (Mouilleron y Golinelli-Pimpaneau, 2007).

Pueden estar situados en la misma cadena polipeptídica (citidina triP (CTP) sintetasa, formilglicinamida sintetasa, guanosina mono-P (GMP) sintetasa, glutamina:PRPP (5-fosforibosil-(α)1-pirofosfato amidotransferasa), glucosamina-6-P sintetasa, asparagina sintetasa), o en distintas subunidades de GATasas heterodiméricas, como antranilato sintetasa (Zalkin, 1973), aminodesoxicorismato

sintasa (Goncharoff y Nichols, 1988), imidazol glicerol-P sintasa (Carlomagno *et al.*, 1988) y carbamil-P sintetasa (Meister, 1989) bacterianas, o incluso situados en subunidades de diferentes enzimas juntos para formar un complejo multienzimático.

La hidrólisis del grupo amido se realiza mediante la cesión de un protón con su electrón al grupo NH_2^- y adición del hidroxilo sobre el carbono 5 (**Fig. 106A**). La situación en la arginina es distinta, ya que sobre el carbono 6 radican una función amino y una función imido, aunque ésta podría representar una analogía funcional estrecha con la anterior debido a su carácter fuertemente básico y a la vecindad de un doble enlace sobre el carbono que soporta el grupo amido (amino en el caso de la arginina) (**Fig. 106B**).

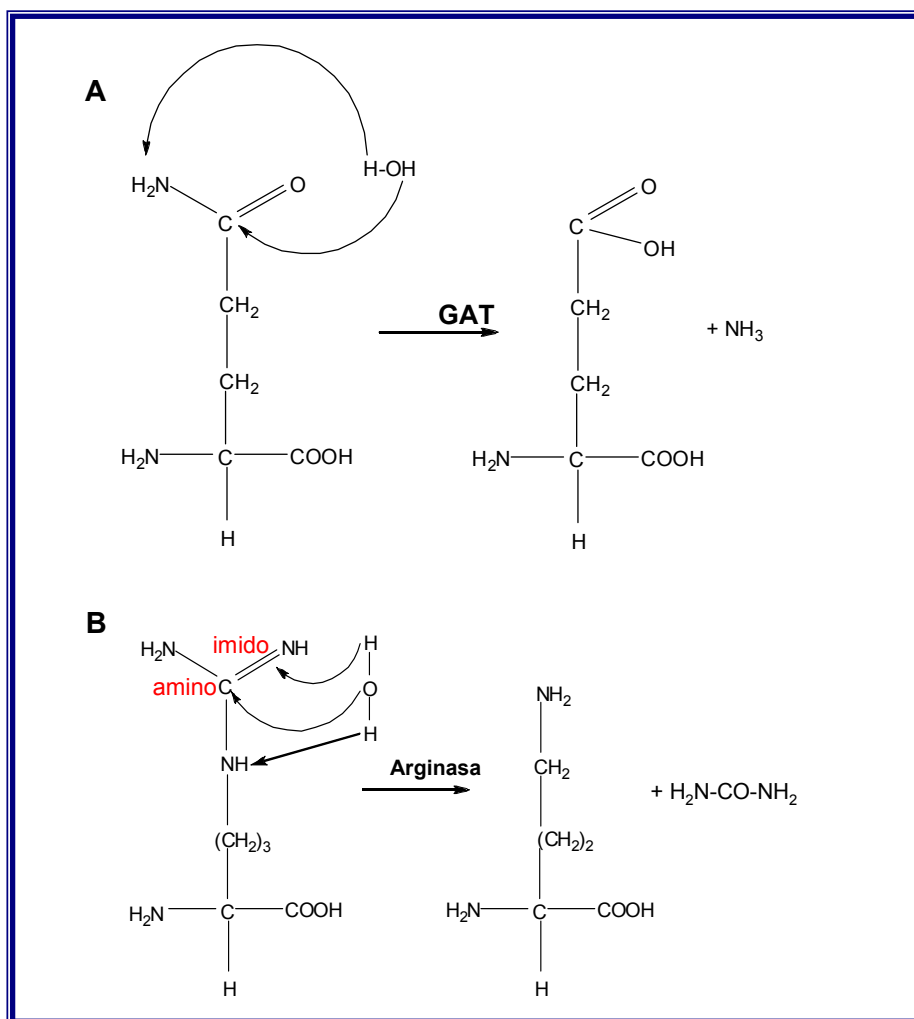


Figura 106. A) Hidrólisis del grupo amido de la glutamina mediado por GAT (Glutámico Aminotransferasa) dando como productos glutamato y amoníaco. B) Acción de la arginasa sobre la arginina rindiendo ornitina y urea.

En la síntesis de la mayoría de los aminoácidos se produce una reacción de transaminación y es en este punto donde se determina la quiralidad de los aminoácidos. La glutamina se sintetiza a partir de NH_4^+ y glutamato. El glutamato es el precursor de otros dos aminoácidos no esenciales: prolina y arginina. En primer lugar, el grupo γ -carboxilo del glutamato reacciona con el ATP para formar un acilfosfato. Posteriormente, el NADPH reduce este anhídrido mixto a un aldehído. Mediante un proceso no enzimático, el γ -semialdehído glutámico pierde una molécula de H_2O y forma el compuesto cíclico Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato, que se reduce a prolina por el NADPH (**Fig. 107**).

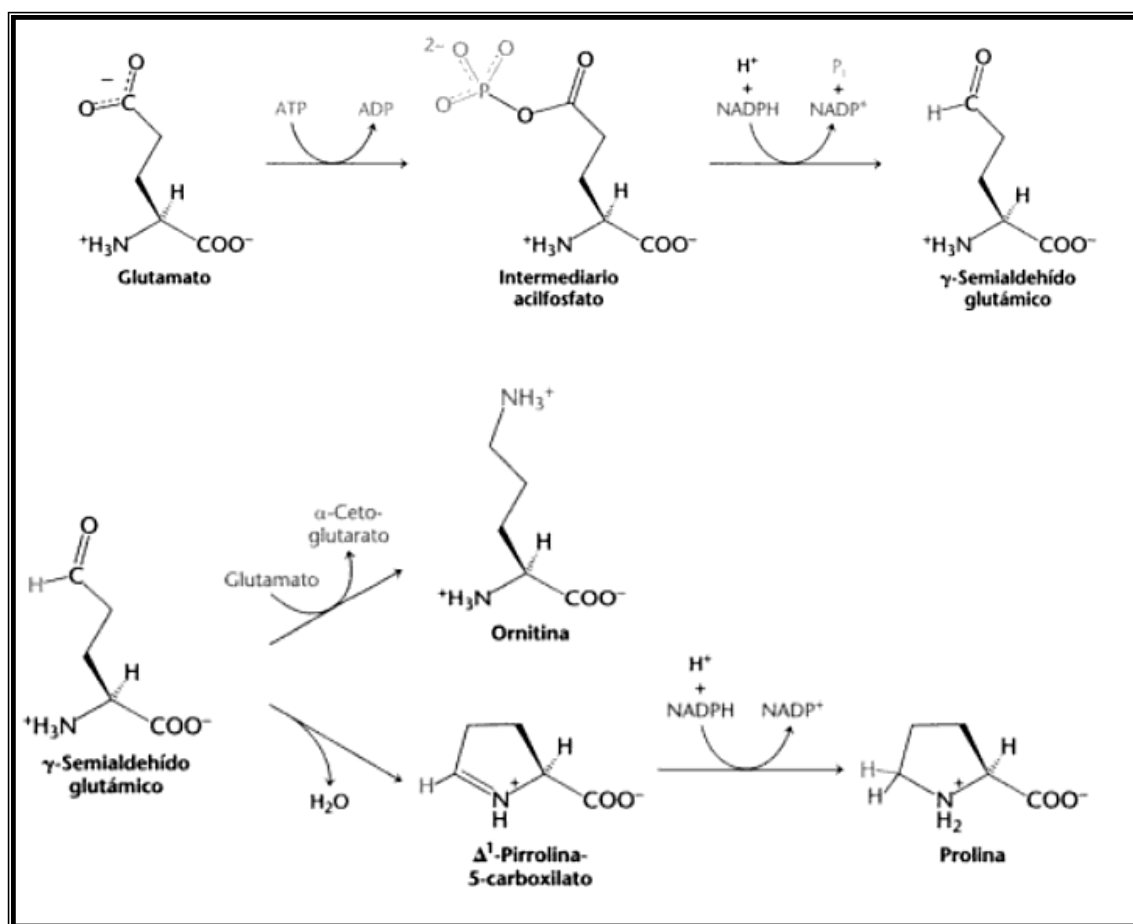


Figura 107. Biosíntesis de los aminoácidos ornitina y prolina con glutamato como precursor (Berg *et al.*, 2008).

Otra posibilidad es que el semialdehído, por transaminación, genere L-ornitina, que se convierte en varias etapas, en arginina (**Fig. 108**) (Berg *et al.*, 2008).

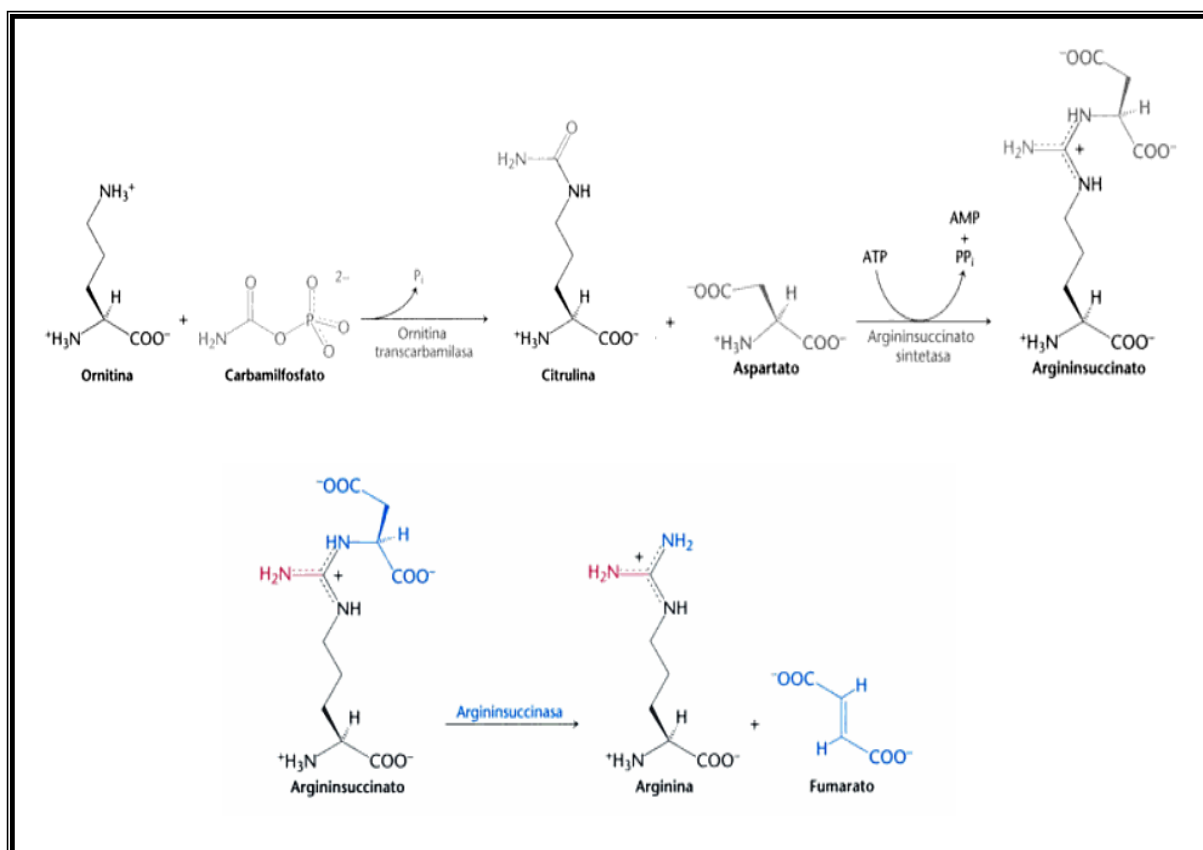


Figura 108. El grupo carbamilo del carbamilfosfato, que tiene un elevado potencial de transferencia debido a su enlace anhídrido, se transfiere a la ornitina para formar citrulina en una reacción catalizada por la ornitina transcarbamilasa. La citrulina se condensa con aspartato por la argininosuccinato sintetasa, la síntesis de argininosuccinato está favorecida por la ruptura del ATP en AMP y pirofosfato, y la consiguiente hidrólisis del pirofosfato. La argininosuccinasa escinde el argininosuccinato en arginina y fumarato (Berg *et al.*, 2008).

Por otro lado, la arginina se hidroliza para producir ornitina y urea en una reacción catalizada por la arginasa (**Fig. 109**). La ornitina pasa a L-glutamato- γ -semialdehído, el cual, después de la acción de la glutamato semialdehído deshidrogenasa, se convierte en L-glutamato (Berg *et al.*, 2008).

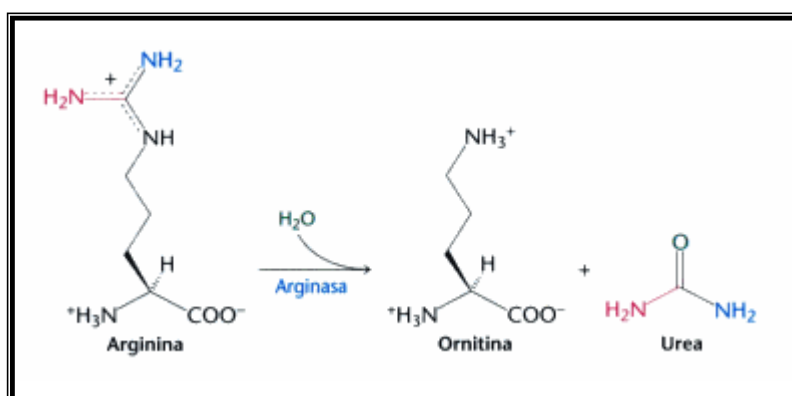


Figura 109. Degradación de la arginina catalizada por la arginasa (Berg *et al.*, 2008).

Arginasa y glutamino amidotransferasa son dos enzimas implicadas en el ciclo de la urea y en el metabolismo del glutamato, respectivamente. La búsqueda de un oligonucleótido de una enzima con actividad arginasa dio como resultado otra molécula codificante de una enzima con actividad diferente, glutamino amidotransferasa, pero con notables analogías, como se ha demostrado antes, debido a que ambas enzimas están involucradas en la ruta de biosíntesis de aminoácidos.

El protocolo experimental partió del diseño de cebadores degenerados en base a secuencias de distintas arginasas de algunas especies de hongos, las publicadas hasta el momento actual en la base de datos NCBI. Dichos cebadores, por definición, amplifican cualquier secuencia de manera inespecífica (Linhart y Shamir, 2005). Por tanto, no se partió de cebadores totalmente específicos que arrancaran la síntesis de una secuencia de arginasa liquénica.

Las secuencias de las arginasas utilizadas en el alineamiento para encontrar el fragmento más conservado y diseñar así los cebadores eran secuencias de ARN mensajero, lo que representa un inconveniente a tener en cuenta: el ARNm no contiene intrones y por tanto no se tiene información sobre si una o varias de las secuencias conservadas utilizadas en el diseño pudiera contener o no intrones. Este es un punto crítico para la detección de cualquier gen, incluso para una primera aproximación como en este caso, ya que se empleaban cebadores basados en secuencias de hongos no liquenizados.

Otro punto débil inherente a la utilización de secuencias de hongos no liquenizados para amplificar secuencias liquénicas es que los genes de líquenes pueden haber evolucionado de forma muy diferente acarreado variaciones en los dominios funcionales dando lugar a secuencias génicas muy distintas. Esta última situación puede conducir a posibles resultados:

- La secuencia inmersa en la región conservada podría haber cambiado y por ello producir productos de PCR más largos o más cortos de lo esperado.
- La estructura enzimática podría haber sido modificada como consecuencia de la pérdida, ganancia o reorganización de los dominios funcionales. La pérdida de estos dominios funcionales derivaría en la pérdida de las secuencias

conservadas. Esto o la reorganización de los mencionados dominios daría como resultado un fracaso en la PCR.

- Las enzimas de hongos no liquenizados pueden no parecerse a las enzimas líquénicas. Aquellos cambios ocurridos en una secuencia completa, incluidos los dominios conservados de arginasas no líquénicas, podrían también resultar en la ausencia de un producto de PCR adecuado porque los cebadores no se unirían al gen.

De todas formas, los residuos bien conservados del sitio GAT para muchas de las GATasas son Pro (P)50, Gly (G)58, Gly (G)60, Cys (C)85, Gln (Q)89, His (H)172 y Glu (E)174 (Mouilleron y Golinelli-Pimpaneau, 2007). En la secuencia de los amplificados obtenidos por nosotros, se observan parcialmente subsecuencias de estos residuos, como, por ejemplo, P194, G197, C199 y G201 (con una inversión G-C), P327, G331, C341 y G345 (conservando idéntica inversión), o C424, Q428 y H435. Estas inversiones no serían extrañas si consideramos la alta variabilidad de reagrupaciones para los diferentes dominios GAT, descritas en la literatura (Zalkin, 1993, Massière y Badet-Denisot, 1998).

Se deja aquí una vía de investigación abierta en la que se continúa trabajando con el propósito de alcanzar este modelo de arginasa para validar la interacción final arginasa-ureasa como base de reconocimiento universal, no sólo para clorobiontes sino también para cianobiontes.

Los resultados expresados en la figuras anteriores, así como su discusión posterior, parecen indicar que las interacciones proteína-ligando entre la arginasa segregable y la ureasa de pared son funcionales tanto en clorolíquenes (*Evernia* y *Xanthoria*), como en cianolíquenes (*Leptogium* y *Peltigera*). La obtención de un oligonucleótido consenso para este tipo de arginasas proporcionará un arma excelente de investigación para la universalización del modelo, ya que bastaría hibridar dicho mensajero con el ADN fúngico para deducir la posible funcionalidad del sistema.

CONCLUSIONS

1. Producción sincrónica de la lectina fúngica, el receptor del clorobionte para la lectina y la división celular en *Evernia prunastri*

La arginasa, que actúa como una lectina fúngica, se segrega de los talos de *Evernia prunastri* principalmente durante la primavera aunque también aparece en el medio durante el otoño. Sin embargo, la ureasa, que se comporta como el ligando de la lectina, se segrega solamente durante el invierno y el otoño y está localizada en la pared celular. En paralelo, la formación de aplanosporangios y la liberación de células pequeñas y jóvenes dentro del talo, se daban bajo condiciones de día corto y bajas temperaturas. Entonces, la sincronización entre la producción del ligando de la lectina y la división celular son necesarios para el reconocimiento de nuevas células de alga por el micobionte.

2. La lectina fúngica se une específicamente a la mitad α -1,4-polygalactosilada de la ureasa localizada en la pared celular de las algas homólogas

Una lectina del liquen *Evernia prunastri*, que desarrolla actividad arginasa, se une a las algas homólogas que contienen ureasa poligalactosilada en sus paredes celulares como ligando para la lectina. La enzima, una vez unida a su ligando, se muestra inactiva para hidrolizar arginina. La hidrólisis de la mitad galactosilada de la ureasa de las algas intactas con α -1,4-galactosidasa libera altas cantidades de D-galactosa e impide la unión de la lectina a la pared celular del alga. Sin embargo, la utilización de β -1,4-galactosidasa libera bajas cantidades de D-galactosa de la pared celular y no cambia el patrón de unión de la lectina a su ligando.

Los clorobiontes incubados con arginasa-ITCF retienen la fluorescencia en sus paredes, la cual puede ser eliminada mediante la adición de galactosa. Las paredes no fluorescentes se observaron después de la incubación de las algas, en las que previamente se había marcado la lectina con el fluoróforo, con α -galactosidasa, recuperando valores bajos de fluorescencia después de la rotura de las células. Esto implica que la lectina entra en las células del alga sin el resto poligalactosilado unido al ligando.

De manera ocasional, la lectina entra en las células en cierta medida incluso cuando las células contienen el ligando sin modificar. Este hecho podría ser debido a la presencia de un número limitado de sitios para el ligando en la pared celular del alga que se satura a bajas cantidades de la lectina. Se puede concluir, por tanto, que la ureasa glicosilada actúa como el principal, (o único) ligando para la arginasa fúngica contiene un α -1,4-D-galactósido unido a la cadena polipeptídica.

3. La falta de un ligando de pared adecuado permite la entrada de la lectina fúngica en las células del alga y provoca la desorganización de los complejos clorofila-proteína en un modo similar a una alta concentración de putrescina

Cuando la ureasa glicosilada no está presente en la pared celular del alga, la arginasa fúngica es internalizada, incrementando los niveles de putrescina, lo que promueve una desorganización del cloroplasto, la activación de glucanasas y la rotura de la pared celular con la consecuente pérdida del protoplasto.

Algunas pruebas experimentales, como los espectros de absorbancia y fluorescencia, la concentración de clorofilas y la medida de la actividad fotosintética, además del análisis de los complejos clorofila-proteína mediante electroforesis capilar y PAGE-SDS, fueron realizados tras la incubación de los clorobiontes de *Evernia* en arginasa fúngica y en concentraciones crecientes de putrescina, además de aquellos en los que la mitad α -1,4-galactosilada había sido previamente hidrolizada con α -1,4-galactosidasa.

Estos dos últimos tratamientos mostraron resultados similares puesto que algunos máximos de absorción cambiaron y la emisión de fluorescencia aumentó como evidencia de una pérdida de la concentración de clorofila y de funcionalidad. Los perfiles electroforéticos de los complejos clorofila-proteína aislados de las algas de *E. prunastri* también indicaban una desorganización en ambos casos mediante la aparición de nuevos péptidos más grandes y más negativamente cargados asociados a restos de pigmentos como consecuencia de los efectos dramáticos de la putrescina.

4. El modelo de reconocimiento celular en clorolíquenes a través de una lectina fúngica que se une a un ligando en el alga puede extenderse a cianolíquenes

Leptogium corniculatum, un cianoliquen conteniendo *Nostoc* como fotobionte, produce y segrega arginasa al medio de incubación conteniendo arginina. Esta arginasa glicosilada segregable ha sido pre-purificada mediante cromatografía de afinidad en lechos de agarosa activada a la cual se ligó una ureasa poligalactosilada purificada de *Evernia prunastri*. La arginasa fue eluída de estos lechos mediante α -D-galactosa. La arginasa eluída se une preferentemente a la superficie celular de *Nostoc* aislado de su talo liquénico, aunque es también capaz de unirse en cierta medida a la superficie celular de clorobiontes aislados de *Evernia prunastri*. El hecho experimentalmente probado de que la lectina fúngica desarrolla una actividad enzimática subsidiaria arginasa actuando como un factor de reconocimiento de células de alga compatibles en clorolíquenes mediante su unión a una ureasa poligalactosilada, ligando de la lectina en la pared celular, puede ahora extenderse a las asociaciones formadas por cianobiontes.

5. Primer intento de elucidación de la secuencia de aminoacídica de algunas lectinas liquénicas

Las arginasas segregables de los talos *Evernia prunastri* y *Xanthoria parietina* que exhiben actividad lectina han sido purificadas a homogeneidad. Los análisis de ambas composiciones aminoacídica y glicosídica también han sido estudiadas. Las proteínas purificadas fueron sometidas a digestión trípica y algunas secuencias de aminoácidos han sido analizadas. Se obtuvo un undecapéptido correspondiente a la arginasa de *Evernia*, el cual muestra un cierto grado de homología con el dominio de unión de Mn^{2+} , un heptapéptido y un undecapéptido de la arginasa de *Xanthoria* que fueron analizados y para los que se encontraron homologías con algunas arginasas de otros hongos y plantas.

6. Extensión del modelo de reconocimiento mediante herramientas de biología molecular

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de reconocimiento celular entre ambos biontes, se trató construir un oligonucleótido de arginasa. De esta manera, este oligonucleótido podría ensayarse para hibridar con ADNs aislados de hongos y algas liquenizados. Podría ser también posible justificar la unión de las arginasa *Evernia prunastri* y *Xhantoria parietina* a la pared celular de ambas algas, homólogas y heterólogas y extender este mecanismo a otras especies de líquenes. El oligonucleótido obtenido presentaba un 79 % de homología con una glutamino amidotransferasa de *Aspergillus terreus*, la cual, junto con la arginasa, participa en algunas rutas de biosíntesis de aminoácidos y en el ciclo de la urea.

RESUME

Lichens are intimate and long-term symbioses of photosynthetic algae or cyanobacteria and heterotrophic fungi joined to form a new biological entity different from its individual components. Recognition of compatible algal cells is carried out by specific lectins produced and secreted by the potential mycobiont. Two forms of glycosylated arginases seem to be involved in the recognition process, one of them, particulated in the cell wall of fungal hyphae and involved in cell contact between phyco- and mycobiont, whereas a second, secreted arginase produces recruitment of compatible algal cells near the surface of fungal hyphae. The ligand for this fungal secreted arginase is a cell wall protein located in *Trebouxia* algae of the phycolichen *Evernia prunastri*, which has turned out to be a polygalactosylated urease.

As stated before, compatibility relies on expression of the ligand for the fungal lectin, which means that urease production and lectin secretion must be synchronized to warrant specific recognition of the daughter cells. Since both arginase and urease are induced proteins, this implied that the peaks of maximum activity of both proteins are the physiological response to the highest content of arginine (to induce arginase) or urea (to induce urease) of thalli in the absence of each one of the nutritional inducers supplied exogenously. However, no aplanosporangia were observed in thallus sections obtained from samples maintained under long-day photoperiod conditions, whereas these were clearly observed in sections maintained under short-day photoperiod conditions, although the occurrence of these cells was not uniform. Distribution of cell size indicated that mature cells occurred more frequently in thalli under long-day conditions, whereas small-sized, young cells were more abundant in lichen thalli under short-day conditions. Although short-day conditions are essential in order to produce small-sized algal cells, low temperatures, naturally associated with short days, cooperate to the formation of aplanosporangia and the liberation of young cells inside the thallus. Ultrastructural changes produced by cold conditions are restricted to an incipient plasmolysis which produces irregular shaped algal cells. Evolution of symbiotic relationships implies then the synchronization of cell division and lectin receptor production probably as a consequence of the perception of environmental factors (light and temperature).

Since arginase lectin, from the mycobiont, binds to the polygalactoside moiety of a cell wall urease, in the photobiont, the nature of the galactosyl bond could be studied by treating phycobiont cells with α - or β -galactosidases. The occasional loss of the binding capability of the lectin could be then related to the partial or total enzymatic hydrolysis of the polygalactoside rest of the ligand. Thus, it can be expected that the

incubation of *Evernia* phycobionts with α - or β -galactosidases will produce degalactosylation of some galactosyl proteins in the surface of the cell wall. We have characterized the lectin ligand as an α -1,4-polygalactosylated urease.

When glycosylated urease is lacking from the algal cell wall, fungal arginase is internalized, increasing the levels of algal putrescine, which promotes chloroplast disorganization, activation of glucanases and breakdown of the cell wall with loss of the protoplast. Evolution of symbiotic relationships implies then the synchronization of cell division and lectin receptor production, probably as a consequence of the perception of environmental factors (light and temperature). Since the lectin entry into compatible algal cells, containing the specific ligand in the cell wall, is avoided, levels of algal putrescine does not increase by the lack of additional, fungal arginase activity to the algal arginine decarboxylase. The maintenance of endogenous levels of PUT did not induce significant structural changes in the phycobiont cells.

SDS-PAGE of chlorophyll-protein complexes isolated from algae recently isolated from thallus samples revealed four major components of 97.5 kDa, 45 kDa, 23.5 kDa and 14.5 kDa of molecular mass. Incubation of algal cells on 40 mM urea revealed similar pattern of separation: bands of 97.5 kDa and 45 kDa were conserved, probably that of 23.5 kDa was modified in its charge and migrates as a complex of 21.5 kDa and the band of 14.5 kDa dissociated in peptides of 6.5 kDa. Identical electrophoretic separation was obtained when fungal arginase was retained outside algal cells by the specific cell wall receptor. However, the entry of fungal arginase into algal cells in absence of the cell wall receptor changes the electrophoretic pattern. Two new, high molecular mass, bands of 116 kDa and 82 kDa appeared, probably by dissociation-association of peptides from that of 97.5 kDa. The complexes of 45 (47) kDa and 23.5 kDa were conserved and that of 14.5 kDa dissociated at 6/8 kDa complexes.

Capillary electrophoresis modifies these results. Two peaks, corresponding to small and middle charge/mass ratio, revealed the major, anionic complexes isolated from algal control. Arginase entry in the absence of cell wall receptor nullified the small complex whereas the entry of the lectin in algae containing the receptor, enzymatically deprived from its polygalactoside chain, provided five anionic complexes from very high to small charge/mass ratio. Similar results were obtained when algae were previously incubated on 5mM and 7mM Putrescine solutions. The retention of the lectin

in the surface of the algal cell wall induced the formation of the only cationic complex analyzed in this way, with a very small charge/mass ratio.

With the aim of going deeply into the mechanism of cell recognition between both bionts, an arginase oligonucleotide model was tried to construct. In this way, this oligonucleotide could be assayed to hybridise with DNAs isolated from lichenized fungi and algae. For this purpose, degenerate primers were designed on the basis of known DNA sequences from several fungal arginases, published in the NCBI GenBank. The sequences were aligned and the higher conserved stretches were found and taken to design the primers. PCR-reactions were performed with all possible combinations of primers, and DNA from culture isolated mycobionts were used as template. In turn, different temperatures of annealing were assayed by constructing several temperature gradients and different DNA polymerases were also tested. The oligonucleotide was 79 % similar to a glutamine amidotransferase subunit from *Aspergillus terreus*. Both enzymes, glutamine amidotransferase and arginase are involved in aminoacids biosynthesis and urea routes.

In summary, fungal lectins provide two different outcomes depending on receptor availability; if the compatible algae expresses a specific cell wall ligand, these act as lectin ligands and the lectin is retained in the cell wall, preventing its penetration into the cell's cytoplasm; on the other hand, when the ligand is lacking they penetrate the cell and produce algal deterioration. This hypothesis is in agreement the fact that the number of cell division cycles of algal cells is under strict control by the mycobiont

To verify the chemical nature of cyanobiont-recognizing fungal lectins, the cyanolichen *Leptogium corniculatum*, containing *Nostoc* as cyanobiont, was used to produce a secreted, glycosylated arginase after incubation of thalli on arginine for short time periods. Separation of secreted proteins by SDS-PAGE indicated that arginase moves in the electrophoretic field according to a molecular mass of 33.1 kDa. This arginase has been prepurified by affinity chromatography on cyanogen bromide-activated agarose to which a polygalactosylated urease from *E. prunastri* phycobionts was attached. Arginase was completely retained in the urease-agarose matrix and only could be efficiently eluted with 50 mM galactose. The eluted protein has a molecular mass of 31 kDa. This is an indirect probe about the ability of *Leptogium* arginase to bind to a cell-wall urease if the cyanobiont cells were able to produce the corresponding lectin receptor. To confirm this possibility, a FITC-labelled arginase secreted from *Leptogium* thalli were supplied to recently isolated *Nostoc* cells

incubated for 1h on 40 mM urea. Fluorescence was detected on the cell wall of the cyanobacteria and it was desorpted by incubating labelled cells in 50 mM galactose. Therefore, the model of cell recognition in chlorolichens through a fungal lectin that binds to an algal ligand can be extended to cyanolichens.

CONCLUSIONS

1. Synchronic production of fungal lectin, chlorobiont lectin receptor and algal division in *Evernia prunastri*

Arginase, which acts as a fungal lectin, is secreted from *Evernia prunastri* thalli mainly during spring although it also appears in the medium during the winter. However, urease, which behaves as a lectin ligand, is only secreted and partially located at the algal cell wall during the autumn and winter. In parallel, aplanosporangia formation and the release of small, young algal cells inside the thallus, occurred under short-day conditions and low temperature values. Thus, the synchronization between the production of the lectin ligand and algal cell division supports the recognition of new algal cells by the mycobiont forming the thallus.

2. The fungal lectin specifically binds to the α -1,4-polygalactoside moiety of urease located in the cell wall of homologous algae

A lectin from the lichen *Evernia prunastri* developing arginase activity binds to homologous algae that contain polygalactosylated urease in their cell walls as a lectin ligand. The enzyme bound to its ligand shows to be inactive to hydrolyze arginine. Hydrolysis of the galactoside moiety of urease in intact algae with α -1,4-galactosidase releases high amount of D-galactose and impedes the binding of the lectin to the algal cell wall. However, the use of β -1,4-galactosidase releases low amounts of D-galactose from the algal cell wall and does not change the pattern of binding of the lectin to its ligand.

Chlorobionts incubated with FITC-arginase retain fluorescence in their cell walls that can be removed by addition of galactose. Non-fluorescent walls were observed after incubation of α -galactosidase-treated algae with FITC-labelled lectin, recovering low values of fluorescence after disrupting algal cells. This implies that the lectin enters algal cells without the polygalactoside attached to the ligand.

Occasionally, lectin enters the cells in some extent even when their cell walls contained the unmodified ligand. This fact could be due to the occurrence of a limited number of ligand sites in the algal cell wall that saturates at low amount of labelled lectin. Thus, it can be concluded that glycosylated urease acting as the main (or

unique) ligand for fungal arginase contains an α -1,4-D-galactoside attached to the polypeptide.

3. The lack of an adequate cell wall ligand allows the entry of the fungal lectin to the algal cells and provokes disorganization of chlorophyll-protein complexes in a similar way to high amounts of putrescine

When glycosylated urease is lacking from the algal cell wall, fungal arginase is internalized, increasing the levels of algal putrescine, which promotes chloroplast disorganization, activation of glucanases and breakdown of the cell wall with loss of the protoplast.

Some experimental probes, such as absorbance and fluorescence spectra, chlorophyll concentration and photosynthetic activity measurement, as well as the analysis of chlorophyll-protein complexes by capillary electrophoresis were performed after incubation on fungal arginase and increasing concentrations of putrescine of *Evernia* chlorobionts as well as those in which the α -1,4-galactosyl moiety had been previously hydrolyzed with α -1,4-galactosidase.

These two last treatments showed similar results since some absorbance maxima changed and fluorescence emission increased as an evidence of loss of chlorophyll concentration and functionality. Electrophoretic traces of chlorophyll-protein complexes isolated from *E. prunastri* algae also indicated disorganization in both cases by the appearance of new bigger and more negatively charged peptides associated to pigment remains as a consequence of the dramatic effects of putrescine.

4. The model of cell recognition in chlorolichens through a fungal lectin that binds to an algal ligand can be extended to cyanolichens

Leptogium corniculatum, a cyanolichen containing *Nostoc* as photobiont, produces and secretes arginase to a culture medium containing arginine. This secreted, glycosylated arginase has been pre-purified by affinity chromatography on a

bead of activated agarose to which a polygalactosylated urease, purified from *Evernia prunastri*, was attached. Arginase was eluted from these beads by α -D-galactose. Eluted arginase binds preferently to the cell surface of *Nostoc* isolated from this lichen thallus, although it is also able to bind in some extent to the cell surface of a chlorobiont isolated from *Evernia prunastri*. The experimentally probed fact that a fungal lectin developing subsidiary arginase activity acted as a recognition factor of compatible algal cells in chlorolichens by binding to a polygalactosylated urease, acting as lectin ligand in the algal cell wall, can be now extended to cyanobiont-forming associations.

5. A first attempt to elucidate the amino acid sequence of some lichen lectins

Secreted arginases from *Evernia prunastri* and *Xanthoria parietina* thalli exhibiting lectin activity have been purified at homogeneity. Analyses of both amino acid and glycoside composition have also been reported. Purified proteins were subjected to tryptic digestion and some amino acid sequences have been analyzed. We obtained one undecapeptide from *Evernia* arginase, which shows a certain degree of homology with the domain to which Mn^{2+} binds, a heptapeptide and an undecapeptide from *Xanthoria* arginase that were analyzed and we found homologies with some arginases from other fungi and plants.

6. An attempt to extend the recognition model by using some molecular biology tools

With the aim of going deeply into the mechanism of cell recognition between both bionts, an arginase oligonucleotide model were tried to construct. In this way, this oligonucleotide could be assayed to hybridise with DNAs isolated from lichenized fungi and algae. It would be also possible to justify the binding of *Evernia prunastri* and *Xanthoria parietina* arginases to the cell wall of both homologous and heterologous algae and to extend this mechanism to other lichens species.

We obtained a sequence with a 79 % homology with a glutamine amidotransferase from *Aspergillus terreus*. Both enzymes, arginase and glutamine

amidotransferase, are implied in urea cycle and glutamate metabolism. Some further work is being done to achieve this arginase model and validate this arginase-urease interaction as the universal base not only for chlorobionts but also for cyanobionts recognition.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadjian, V.** 1973. Methods of isolating and culturing lichen symbionts and thalli. En: Ahmadjian, V., Hale, M. E. (Eds.), *The Lichens*. Academic Press, New York. Pp: 653-659.
- Ahmadjian, V.** 1987. Coevolution in lichens. *Ann. New York Acad. Sci.*, 503: 307-315.
- Ahmadjian, V.** 1993. *The lichen symbiosis*. John Wiley & Sons, Inc. New York
- Ahmadjian, V., Jacobs, J. B., Russell, L. A.** 1978. Scanning electron microscope study of early lichen synthesis. *Science*, 200: 1062-1064.
- Ahmadjian, V., Jacobs, J. B.** 1981. Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck. *Nature*, 289: 169-172.
- Ahmadjian, V., Jacobs, J. B.** 1985. Artificial reestablishment of lichens. VI. Comparison between natural and synthetic thalli of *Usnea strigosa*. *Lichenologist*, 17: 149-166.
- Aisaka, K., Uwajima, T., Terada, O.** 1984. Kinetic properties of galactose oxidase from *Gibberella fujikuroi*. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 1425-1431.
- Allen, J. F., Bennett, J., Steinback, K. E. Arntzen, C. J.** 1981. Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature*, 291: 25-29.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389–3402.
- Anderson, J. M.** 1980. P-700 content and polypeptide profile of chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoid. *Biochim. Biophys. Acta.*, 591: 113-126.
- Anderson, J. M.** 1983. Chlorophyll-protein complexes of a *Codium* species, including a light-harvesting siphonaxanthin-chlorophyll *a/b*-protein complex, an evolutionary relic of some chlorophyta. *Biochim Biophys. Acta.*, 724: 370-380.
- Andersson, B., Anderson, J. M.** 1980. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, 593:427–440.
- Andrews, G. A., Chavey, P. S., Smith, J. E.** 1992. Reactivity of lichen lectins with blood typed canine erythrocytes. *Res. Vet. Sci.*, 53: 315-319.
- Arahal, D. R., Lekunberri, I., González, J. M., Pascual, J., Pujalte, M. J., Pedrós-Alió, C., Pinhassi, J.** 2007. *Neptuniibacter caesariensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine genome-sequenced gammaproteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57:1000-1006.

Armaleo, D., Clerc, P. 1991. Lichen chimeras: DNA analysis suggests that one fungus forms two morphotypes. *Exptl. Mycol.*, 15: 1-10.

Arnon, D. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1-15.

Arup, U. 2002. PCR techniques and automated sequencing in lichens. En: Kranner, I., Beckett, R. P., Varma, A. K. (Eds.), *Protocols in lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and the Use in Biomonitoring*. Springer Lab Manual. Springer Verlag, Berlin. Pp: 392-411.

Ávalos, A., Vicente, C. 1987. The occurrence of lichen phenolics in the photobiont cells of *Evernia prunastri*. *Plant Cell Reports*, 6: 74-76.

Barber, J. 1980. An explanation for the relationship between salt-induced thylakoid stacking and the chlorophyll fluorescence changes associated with changes in spillover of energy from photosystem II to photosystem I. *FEBS Letters*, 118: 1-10.

Barrett, J. T., Howe, M. L. 1968. Hemagglutination and hemolysis by lichen extracts. *Appl. Microbiol.*, 16: 1137-1139.

Bassi, R., Simpson, D. 1987a. Light-harvesting chlorophyll-proteins of barley photosystem I. *Progress in Photosynth. Res.*, 11: 61-64.

Bassi, R., Simpson, D. 1987b. The organisation of photosystem II chlorophyll-proteins. *Progress in Photosynth. Res.*, 11: 81-88.

Bennett, J. 1979. Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes is light-dependent. *FEBS Letters*, 103: 342-344.

Bennett, J., Steinback, K. E., Arntzen, C. J. 1980. Chloroplast phosphoproteins: Regulation of excitation energy transfer by phosphorylation of thylakoid membrane polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5253-5257.

Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J., Maraculla, J. M. 2008. Biosíntesis de Aminoácidos. En: *Biochemistry*. Reverté. Pp: 679-709.

Bergman, B., Rai, A. N., Johanson, C., Söderbäck, E. 1993. Cyanobacterial-plant symbioses. *Symbiosis*, 14: 61-81.

Berheimer, A. M., Farkas, M. E. 1953. Hemagglutinins among higher fungi. *J. Immunol.*, 70: 197-198.

Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 62: 293-300.

Berthold, D. A., Babcock, G. T., Yocum, C. F. 1981. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Letters*, 134: 231-234.

Besford, R. T., Richardson, C., Campos, J. L., Tiburcio, A. F. 1993. Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta*, 189: 201-206.

Blanco, M. J., Suárez, C., Vicente, C. 1984. The use of urea by *Evernia prunastri* thalli. *Planta*, 162: 305-310.

Boekema, E. J., Hifney, A., Yakushevskaya, A. E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K. P., Pistorius, E. K., Kruip, J. 2001. A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature*, 412: 745-748.

Bolhàr-Nordenkamp, H. R., Öquist, G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall, D. O., Scurlock, J. M. O., Bolhàr-Nordenkamp, H. R., Leegood, R. C., Long, S. P. (Eds.), *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.

Brown, D. H., Rapsch, S., Beckett, A., Ascaso, C. 1987. The effect of desiccation on cell shape in the lichen *Parmelia sulcata*. *Taylor. New Phytol.*, 105: 295-299.

Brunauer, G., Hager, A., Grube, M. Türk, R., Stocker-Wörgötter, E. 2007. Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages. *Plant Physiol. Biochem.*, 45: 146-151.

Bubrick, P. 1988. Effects of symbiosis on the photobiont. En: Galun, M. (Ed.), *Handbook of lichenology*. CRC Press, Boca Raton, FL. Vol 2. Pp: 133-144.

Bubrick, P., Frensdorff, A., Galun, M. 1985. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. which bind to phycobiont cell walls. Isolation and partial purification of an algal-binding protein. *Symbiosis*, 1: 85-95.

Bubrick, P., Galun, M. 1980. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Correlation between binding patterns and cell wall cytochemistry. *Protoplasma*, 104: 167-173.

Bubrick, P., Galun, M., Frensdorff, A. 1981. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Localization in the intact lichen and cultured mycobiont. *Protoplasma*, 105: 207-211.

Caffaro, S. V., Mateos, J. L., Vicente, C. 1996. Changes in the activity of an enzymatic marker bound to plasmalemma during the photoperiodic flowering induction of soybean. *Phyton*, (Austria), 36: 9-28.

Camm, E. L., Green, B. R. 1980. Fractionation of thylakoid membranes with non-ionic detergent octyl- β -D-glucopyranoside: Resolution of chlorophyll-protein complex II into two chlorophyll-protein complexes. *Plant Physiol.*, 66:428-432.

Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A. K., Gustafsson, P., Öquist, G. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial. Photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 667–683.

Canales, M., Westermeyer, L., Carvajal, N. 2001. Molecular dynamics simulations of active site mutants of rat liver arginase. *Electronic J. Biotechnol.*, 4: 153-159.

Carlomagno, M. S., Chiarotti L., Alifano P., Nappo A. G., Bruni C. B. 1988. Structure and function of the *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* K-12 histidine operons. *J. Mol. Biol.*, 203: 585–606.

Chen, M., Quinnell, R. G., Larkum, A. W. D. 2002. The major light-harvesting pigment protein of *Acaryochloris marina*. *FEBS Letters*, 514: 149-152.

Cheng, S. H., Shyr, Y. Y., Kao, C. H. 1984. Senescence of rice leaves. XII. Effects of 1,3-diaminopropane, spermidine and spermine. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 25: 191-196.

Chrispeels, M. J., Raikhel, N. V. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3: 1-9.

Cocchietto, M., Skert, N., Nimis, P.L., Sava, G. 2002. A review of usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89: 137-146.

Cohen, A. S., Popovic, R. B., Zalik, S. 1979. Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity, and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. *Plant Physiol.*, 64: 717-720.

Compton, T. 1990. Degenerate primers for DNA amplification. En: Innis, Gelfand, Sninsky, White (Eds.), *PCR Protocols*. Academic Press, New York. Pp. 39-45

Conway, E. J. 1962. Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood, London. Pp. 97-102.

Coutiño, B., Montañez, A. L. 2000. Los líquenes. *Ciencias*, 59 : 64-65.

Crowley, J. F., Goldstein, J. J., Arnarp, J., Lönnngre, J. 1984. Carbohydrate binding studies on the lectin from *Datura stramonium* seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 231: 524-533.

Cubero, O. F., Crespo, A. 2002. Isolation of nucleic acids from lichens. En: Kranner, I., Beckett, R. P., Varma, A. K. (Eds.), *Protocols in lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and the Use in Biotmonithoring*. Springer Lab Manual. Springer Verlag, Berlin. Pp: 381-391.

Cubero, O. F., Crespo, A., Fatehi, J., Bridge, P. D. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant System. Evol.*, 216: 243-249.

Culberson, C. F. 1969. Chemical and botanical guide of lichen products. University of North Carolina Press, Chapel Hill. Pp: 117-175.

Culberson, C. F., Ahmadjian, V. 1980. Artificial reestablishment of lichens. II: Secondary products of resynthesized *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. *Mycologia*, 72: 90-109.

Culberson, C. F., Kristinsson, H. 1970. A standarized method for the identification of lichen products. *J. Chromatog.* 46: 85-93.

Czeczuga, B., Czeczuga-Sumenik, E. 2002. Seasonal changes in the size of phyco- and photobiont cells in some lichen species of the Knyszynska Forest (N-E Poland). *J. Hattori Bot. Lab.*, 92: 261-275.

Czeczuga, B., Czeczuga-Sumenik, E. 2003. Effect of light quality on the size of phyco- and photobiont cells of some lichen species from the Knyszynska forest (N-E Poland). *J. Hattori Bot. Lab.*, 93: 189-200.

Czeczuga, B., Krukowska, K. R. 2001. Effect of habitat conditions on phycobionts and the content of photosynthesising pigments in five lichen species. *J. Hattori Bot. Lab.*, 90: 293-305.

De los Ríos, A., Ascaso, C. 2002. Preparative techniques for transmission electron microscopy and confocal laser scanning microscopy of lichens. En: Kranner, I., Beckett, R. P., Varma, A. K. (Eds.), *Protocols in lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and the Use in Biotmonithoring*. Springer Lab Manual. Springer Verlag, Berlin. Pp: 87-117.

Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J. R., Pan, H., Read, N. D., Lee, Y. H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y. Y., Donofrio, N., Jeong, J. S., Soanes, D. M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M. H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L. J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J. E., Birren, B. W. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 434: 980-986.

Díaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J. Lugtenberg, B. J. J., Kijne, J. W. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*, 338: 579-581.

Díaz, E. M., Sacristán, M., Legaz M. E., Vicente, C. 2009. Isolation and characterization of a cyanobacterium-binding protein and its cell wall receptor in the lichen *Peltigera canina*. Aceptado en: *Plant Signaling & Behavior*.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.

Dykstra, M.J. 1992. Biological electron microscopy. Theory, techniques and troubleshooting. Plenum Press, New York.

Elad, Y., Barak, R., Chet, J. 1983. Possible role of lectins in mycoparasitism. *J. Bacteriol.*, 154: 1431-1435.

Elifio, S. L., Silva, M. L. C. C. M., Iacomini, M., Gorin, P. A .J. 2000. A lectin from the lichenized Basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *New Phytol.*, 148: 327-334.

Elix, J. A., Whitton, A. A. 1984. Recent progress in the chemistry of lichen sustances. En: Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. W., (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer Verlag, Viena. Pp. 103-234.

Escribano, M. I., Legaz, M. E. 1984. L-Ornithine decarboxylase from *Evernia prunastri*. *Phyton*, 44: 171-177.

Escribano, M. I., Legaz, M. E. 1988. High performance liquid chromatography of the dansyl derivatives of putrescine, spermidine and spermine. *Plant Physiol.*, 87: 519-522.

Estola, E., Vartia, K. O. 1955. Phytoagglutinins in lichens. *Ann. Med. Exptl. Biol. Fennicae*, 33: 392-395.

Fariers, A., Wuilmart, C., Sharon, N., Strosberg, D. 1977. Extensive sequence homologies among lectins from leguminous plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75: 980-986.

Fiechter, E., Honegger. R. 1988. Seasonal variations in the fine structure of *Hypogymnia physodes* (lichenized ascomycetes) and its *Trebouxia* photobiont. *Plant Syst. Evol.*, 158: 249-263.

Fontaniella, B., Millanes, A. M., Vicente, C., Legaz, M. E. 2004. Concanavalin A binds to a mannose-containing ligand in the cell wall of some lichen phycobionts. *Plant Physiol. Biochem.*, 42: 773-779.

Fontaniella, B., Molina, M. C., Vicente, C. 2000. An improved method for the separation of lichen symbionts. *Phyton*, 40: 323-328.

- Fracheboud, Y.** 2004. Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. Presentation from the Institute of Plant Sciences ETH, Universitätstrasse 2, CH-8092 Zürich.
- Friedl, T.** 1989. Comparative ultrastructure of pyrenoids in *Trebouxia* (Microthamniales, Chloophyta). *Plant Syst. Evol.*, 165: 145-149.
- Galun, M.** 1991. Lichen research: an overview with some emphases. En: Nardon, P., Gianinazzi-Pearson, V., Grenière, A.M., Margulis, L., Smith, D.C. (Eds.), *Endocytobiology*, INRA, Paris. Pp. 161-168.
- Galun, M., Kardish, N.** 1995. Lectins as determinants of symbiotic specificity in lichens. *Cryptog. Bot.*, 5: 144-148.
- Gargas, A., DePriest, P. T., Grube, M., Theler, A.** 1995. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogenies. *Science*, 268: 1492-1495.
- Gargas, A., Taylor, J.** 1992a. Molecular systematics of lichenized and non-lichenized fungi based on rDNA sequences. En: *Int Ass Lichen Symp.*, Abstracts, 9.
- Gargas, A., Taylor, J.** 1992b. Polymerase Chain Reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycol.*, 84: 589-592.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Brewin, N. J.** 1990. Immunocytochemical localisation of antigenic sites in the perisymbiotic membrane of vesicular-arbuscular endomycorrhiza using monoclonal antibodies reacting against peribacteroid membrane of nodules. En: Nardon, P., Gianinazzi-Pearson, V., Grenier, A.M., Margulis, L., Smith, D.C. (Eds.), *Endocytobiology IV*. INRA. Paris. Pp. 127-131.
- Giles, K. L.** 1970. The phytochrome system, phenolics compounds, and aplanospore formation in a lichenized strain of *Trebouxia*. *Can. J. Bot.*, 48: 1343-1346.
- Glebs, A., Stencel, E., Knoche, K.** 2003. The Go-To Choice: GoTaq™ DNA Polymerase. Introducing GoTaq™ DNA Polymerase: Improved Amplification with a choice of buffers. *Promega Notes*, 83: 21-24.
- Golaz, O., Gravel, P., Walzer, C., Turler, H., Balant, L., Hochstrasser, D. F.** 1995. Rapid detection of the human plasma glycoproteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis lectin affino blotting. *Electrophoresis*, 16: 1187-1189.
- Goldraij, A., Coello, P., Polacco, J. C.** 1998. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a soybean seedling axes arginase. *Plant Physiol.*, 116: 867
- Gomori, M.** 1952. *Microscopic Histochemistry. Principles and Practice*. The University of Chicago Press, Chicago.

Goncharoff, P., Nichols, B. P. 1988. Evolution of aminobenzoate synthases: nucleotide sequences of *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella aerogenes pabB*. Mol. Biol. Evol., 5: 531–548.

Gottlieb, M., Chavko, M. 1987. Silver staining of native and denatured eukaryotic DNA in agarose gels. Anal. Biochem., 165: 33-37.

Greenberg, D. M. 1955. Arginase. En: Kolowick, S. P., Kaplan, N. O. (Eds.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York. Vol. 2. Pp: 368-374.

Grube, M., Hawksworth, D. L. 2007. Trouble with lichen: the re-evaluation and re-interpretation of thallus form and fruit body types in the molecular era. Mycol. Res., 111: 1116–1132.

Guarino, L. A., Cohen, S. S. 1979. Mechanism of toxicity of putrescine and its lethality in *Anacystis nidulans*. Proc. Natl Acad. Sci. USA., 76: 3660-3664.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol., 166: 557-580.

Heath, I. B. 1987. Preservation of labile cortical array of actin filaments in growing hyphal tips of the fungus *Saprolegnia ferax*. Eur. J. Cell Biol., 44: 10-16.

Heerze, L. D., Armstrong, G. D. 1993. Carbohydrate recognition domains of *Pertussis* toxin. Trends Glycosci. Glycotechnol., 5: 428-442.

Heerze, L. D., Chong, P. C. S., Armstrong, G. D. 1992. Investigation of the lectin-like binding domains in *Pertussis* toxin using synthetic peptide sequences. J. Biol. Chem., 267: 25810-25815.

Hill, D. J. 1980. The physiology of lichens. En: Brown, D. H. Hawksworth, D. L., Bailey, R. H. (Eds.), Lichenology: Progress and Problems, Academic Press, New York. Pp: 457-473.

Hill, R. 1939. Oxygen produced by isolated chloroplasts. Proc. R. Soc. Lond. B., 127: 192-210.

Hoedemaeker, F. J., van Eijsden, R. R., Diaz, C. L., de Parker, B. S., Kijne, J. W. 1993. Destabilization of pea lectin by substitution of a single amino acid in a surface loop. Plant Mol. Biol., 22: 1039-1046.

Honda, N. K., Vilegas, W. 1999. The chemistry of lichens. Quím. Nova, 22: 110-125.

Honneger, R. 1984. Cytological aspects of the mycobiont-phytobiont relationships in lichens. Haustorial types, phycobiont cell wall types, and the ultrastructure of the cell wall surface layers in some cultured and symbiotic myco- and phycobionts. Lichenologist, 16: 111-127.

Honneger, R. 1985. Fine structure of different types of symbiotic relationships in lichens. En: Brown, D.H. (Ed.) *Lichen Physiology and Cell Biology*, Plenum Press, New York. Pp: 287-302.

Honneger, R. 1986. Ultrastructural studies in lichens. II. Mycobiont and photobiont cell wall surface layers and adhering crystalline lichen products in four *Parmeliaceae*. *New Phytol.*, 103: 797-808.

Honneger, R. 1987. Questions about pattern formation in the algal layer of lichens with stratified (heteromorous) thalli. *Bibl. Lichenol.*, 25: 59-71.

Honneger, R. 1991a. Functional aspects of lichen symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 553-578.

Honneger, R. 1991b. Symbiosis and fungal evolution: symbiosis and morphogenesis. En: Margulis, L., Fester, R. (Eds.). *Evolution and Speciation: Symbiosis as a source of Evolutionary Innovation*, MAMIT Press. Pp: 32-49.

Honneger, R. 2001. The symbiotic phenotype of lichen-forming ascomycetes. En: Hock, B. (Ed.). *The Mycota. Fungal Associations*. Vol. 9. Springer Verlag, Berlin. Pp: 165–188.

Honneger, R., Brunner, R. 1981. Sporopollenin in the cell walls of *Coccomyxa* and *Myrmecia* phycobionts of various lichens: an ultrastructural and chemical investigation. *Can. J. Bot.*, 59: 2713-2734.

Horton, P., Black, M. T. 1980. Activation of Adenosine 5'-triphosphate-induced quenching of chlorophyll fluorescence by reduced plastoquinone. *FEBS Letters*, 119: 141-144.

Howe, M. C., Barrett, J. T. 1970. Studies on hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 215: 97-104.

Ikeuchi, M., Yuasa, M., Inoue, Y. 1985. Simple and discrete isolation of an O₂-evolving PSII reaction center complex retaining Mn and the extrinsic 33 kDa protein. *FEBS Letters*, 185: 316-322.

Jahns, H. M. 1988. The lichen thallus. En: Galun, M. (Ed.), *Handbook of Lichenology*, Vol I, Boca Raton, CRC Press. Pp. 95-143.

Kamemura, K. Furuichi, Y., Umekawa, H., Takahashi, T. 1993 Purification and characterization of novel lectins from Great Northern bean, *Phaseolus vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1158: 181-188.

Kantzilakis, K., Aivaliotis, M., Kotakis, C., Krasanakis, F., Rizos, A. K., Kotzabasis, K., Tsiotis, G. 2007. A comparative approach towards thylakoid membrane proteome analysis of unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768: 2271– 2279.

Kanyo, Z. F., Scolnick, L. R., Ash, D. E., Christianson, D. W. 1996. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*, 383: 554-557.

Kardish, N., Silberstein, L., Flemminger, G., Galun, M. 1991. Lectin from the lichen *Nephroma laevigatum*. Localization and function. *Symbiosis*, 11: 47-62.

Kaur-Sawhney, R., Galston, A. W. 1979. Interaction of polyamines and light on biochemical processes involved in leaf senescence. *Plant Cell Environ.*, 2: 189-196.

Kawamoto, S., Amaya, Y., Murakami, K., Tokunaga, F., Iwanaga, S., Kobayashi, K., Saheki, T., Kimura, S., Mori, M. 1987. Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver arginase. *J. Biol. Chem.*, 262: 6280-6283.

Kilpatrick, D. D., Yeoman, H. M. 1978. Purification of the lectin from *Datura stramonium*. *Biochem. J.* 175: 1151-1153.

Krause, G., Weis, E. 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth. Res.*, 5: 139-157.

Krause, G. H., Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42:313-349.

Kumar, M. A., Timm, D. E., Neet, K. E., Owen, W. G., Peumans, W. J., Rao, A. G. 1993. Characterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 268: 25176-25183.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lange, O. L., Tenhunen, J. D. 1981. Moisture content and CO₂ exchange of lichens. II. Depression of net photosynthesis in *Ramalina maciformis* at high water content is caused by increased thallus carbon dioxide diffusion resistance. *Oecologia*, 51. 426-429.

Larson, D. W. 1984. Habitat overlap/ niche segregation in two *Umbilicaria* lichen talli: a possible mechanism. *Oecologia*, 62. 118-125.

Lee, T. M. 1998. Investigations of some intertidal green macroalgae to hyposaline stress: Detrimental role of putrescine under extreme hyposaline conditions. *Plant Sci.*, 138: 1-8.

Legaz, M. E. 1985. The regulation of urea biosynthesis. En: Vicente, C., Brown, D. H., Legaz, M. E. (Eds.). *Surface Physiology of Lichens*, Ed. Universidad Complutense, Madrid. Pp: 57-72.

Legaz, M.E. 1991. Regulation of different arginase forms in *Evernia prunastri* thallus. *Symbiosis*, 11: 263-277.

Legaz, M. E., Ávalos, A., de Torres, M., Escribano, M. I., González, A., Martín-Falquina, A., Pérez-Urria, E., Vicente, C. 1986. Annual variations in arginine metabolism and phenolic content of *Evernia prunastri*. Environ. Exp. Bot., 26: 385-396.

Legaz, M.E., Fontaniella, B., Millanes, A.M., Vicente, C. 2004. Secreted arginases from phylogenetically far-related lichen species act as cross-recognition factors for two different algal cells. Eur. J. Cell Biol., 83: 435-446.

Legaz, M. E., González de Buitrago, G, Vicente, C. 1982. Exogenous supply of L-arginine modifies free aminoacid content in *Evernia prunastri* thallus. Phytton, 42: 213-218.

Legaz, M. E., Molina, M. C., Vicente, C. 2003. Lichen Lectins: glycoproteins for cell recognition. Curr. Topics Biol., 4: 63-78.

Legaz, M. E., Pedrosa, M. M. 1993. Separation of acidic proteins by capillary zone electrophoresis and size-exclusion HPLC: a comparison. J. Chromatog. A., 665: 21-29.

Legaz, M. E., Vicente, C. 1980. Arginase regulation in *Evernia prunastri*. Crytog. Bryol. Lichenol. 1: 407-414.

Legaz, M. E., Vicente, C. 1981. Location of several enzymes of L-arginine catabolism in *Evernia prunastri* thallus. Z. Naturforsch., 36c: 692-693.

Legaz, M.E., Vicente, C. 1982. Two forms of arginase in *Evernia prunastri*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 104: 1441-1446.

Legaz, M. E., Vicente, C. 1983. Endogenous inactivators of arginase, L-arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. Plant Physiol., 71: 300-302.

Legaz, M. E., Vicente, C. 1989. Regulation of urease activity in *Cladonia dendroides* and its photobiont by lichen phenols. Plant Sci., 63: 15-24.

Legaz, M. E., Vicente, C., Pedrosa, M. M. 2001. Binding of lichen phenolics to purified secreted arginase from the lichen *Evernia prunastri*. J. Biochem. Mol. Biol., 34: 194-200.

Legget-Bailey, I. 1967. Techniques in protein chemistry. Elsevier. Amsterdam. Pp : 278.

Lehr, H., Fleminger, G., Galun, M. 1995. Lectin from the lichen *Peltigera membranacea*: Characterization and function. Symbiosis, 18: 1-13.

Lehr, H., Galun, M., Ott, S., Jahns, H. M., Fleminger, G. 2000. Cephalodia of the lichen *Peltigera aphthosa*. Specific recognition of the compatible photobiont. Symbiosis, 29: 357-365.

- Linhart, C., Shamir, R.** 2005. The degenerate primer design problem: theory and applications. *J. Comp. Biol.*, 12: 431-456.
- Lison, L.** 1960. *Histochemie et Cytochemie Animales. Principes et methodes.* Gauthier Villard, Paris.
- Lockhart, C. M., Rowell, P., Stewart, W. D. P.** 1978. Phytohaemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 3: 127-130.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Lutzoni, F., Vilgalys, R.** 1995. *Omphalina* (Basidiomycota, Agaricales) as a model system of study of coevolution in lichens. *Cryptog. Bot.*, 5: 71-81.
- Mandel, D. K., Nieves, E., Bhattacharyya, L., Orr, G. A., Roboz, J., Yu, Q., Brewer, C. F.** 1994. Purification and characterization of three isolectins of soybean agglutinin. Evidence for C-terminal truncation by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* 221: 547-553.
- Mäntsälä, P., Zalkin, H.** 1984. Glutamine amidotransferase function. Replacement of the active-site Cysteine in Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by site-directed mutagenesis. 1984. *J. Biol. Chem.*, 259: 14230-14236.
- Marathe, S., Yu, Y. G., Turner, G. E., Palmier, C., Weiss, R. L.** 1998. Multiple forms of arginase are differentially expressed from a single locus in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, 273: 29776-29785.
- Marx, M., Peveling, E.** 1983. Surface receptors in lichen symbionts visualized by fluorescence microscopy after use of lectins. *Protoplasma*, 114: 52-61.
- Massière, F., Badet-Denisot, M. A.** 1998. The mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 54: 205–222.
- Mateos, J. L., Pedrosa, M. M., Molina, M. C., Pereira, E. C., Vicente, C., Legaz, M. E.** 1993. Involvement of phytochrome-mediated cyclic AMP in the synthesis and deposition of fumarprotocetraric acid on the cortical hyphae of *Cladonia verticillaris*. *Plant Physiol. Biochem.*, 31: 667-674.
- Maxwell, K., Johnson, G. N.** 2000. Chlorophyll fluorescence, a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51: 659-668.
- Meeks, J.C., Elhai, J.** 2002. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66: 94-121.

- Mehrotra, R. S., Aneja, K. R.** 1990. An Introduction to Mycology. Wiley Eastern Limited, New Delhi. Pp. 706.
- Meister A.** 1989. Mechanism and regulation of the glutaminedependent carbamyl phosphate synthetase of *Escherichia coli*. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 62: 315-374.
- Melis, A., Spangfort, M., Andersson, B.** 1987. Light-absorption and electron-transport balance between photosystem II and photosystem I in spinach chloroplasts. Photochem. Photobiol., 45: 129-136.
- Millanes, A. M., Fontaniella, B., García, M. L., Solas, M. T., Vicente, C., Legaz, M. E.** 2004. Cytochemical location of urease in the cell wall of two different lichen photobionts. Tissue & Cell, 36: 373-377.
- Millanes, A. M., Vicente, C.** 2003. Photoprotective strategies in lichens: an experimental approach using *Evernia prunastri*. J. Hattori Bot. Lab., 94: 293-302.
- Millibank, J. W.** 1972. Nitrogen metabolism in lichens. IV. The nitrogenase activity of the *Nostoc* phycobiont in *Peltigera canina*. New Phytol., 71: 1-10.
- Milloning, G.** 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation. J. Appl. Phys., 32 : 1637-1639.
- Min, W., Dunn, A. J., Jones, D. H.** 1992. Non-glycosylated pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. Eur. Mol. Bio. Org. J., 11: 1393-1307.
- Miura, S., Yokota, A.** 2006. Isolation and characterization of cyanobacteria from lichen. J. Gen. Appl. Microbiol., 52: 365-374.
- Molina, M. C., Bajon, C., Sauvanet, A., Robert, D., Vicente, C.** 1998a. Detection of polysaccharides and ultrastructural modification of the photobiont cell wall produced by two arginase isolectins from *Xanthoria parietina*. J. Plant Res., 111: 191-197.
- Molina, M. C., Muñiz, E., Vicente, C.** 1993. Enzymatic activities of algal-binding protein and its algal cell wall receptor in the lichen *Xanthoria parietina*. An approach to the parasitic basis of mutualism. Plant Physiol. Biochem., 31: 131-142.
- Molina, M. C., Stocker-Wörgötter, E., Türk, R., Bajon, C., Vicente, C.** 1998b. Secreted, glycosylated arginase from *Xanthoria parietina* thallus induces loss of cytoplasmic material from *Xanthoria* photobionts. Cell Adh. Commun., 6: 481-490.
- Molina, M. C., Stocker-Wörgötter, E., Zorer, R., Türk, R., Vicente, C.** 1997. Comparison between recent-isolated and cultured populations of phycobionts from *Xanthoria parietina*. En: Schenck, H. E. A., Hermann, R. G., Jeon, K. W., Müller, N. E., Schwemmler, W. (Eds.), Eukariotism and Symbiosis. Springer Verlag, Berlin. Pp.:484-490.

Molina, M. C., Vicente, C. 1993. Loss of photoergonic conditions of *Xanthoria parietina* photobiont effected by an algal-binding protein isolated from the same lichen species. En: Sato, S., Ishida, M., Ishikawa, H. (Eds.), Endocytobiology V: Endocytobiology and Symbiosis. Tübingen University Press, Tübingen. Pp: 81-84.

Molina, M. C., Vicente, C. 1995. Correlationships between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina* phycobionts. Cell Adhesion Commun. 3: 1-12.

Molina, M. C., Vicente, C. 1996. High-performance liquid chromatographic characterization of two lichen lectins with arginase activity differing in their glycosyl moiety. J. Liquid Chromatogr. Rel. Techn. 19: 2101-2115.

Molina, M. C., Vicente, C. 2000. Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. J. Biochem. Mol. Biol. 33: 300-307.

Molina, M. C., Vicente, C., Pedrosa, M. M., Legaz, M. E. 1997. Isoforms of arginase in the lichens *Evernia prunastri* and *Xanthoria parietina*: physiological roles and their implication in the controlled parasitism of the mycobiont. En: Schenk, H. E. A., Herrmann, R. G., Jeon, K. W., Müller, N. E., Schwemmler, W. (Eds.). Eukaryotism and Symbiosis. Springer Verlag, Berlin. Pp: 477-483.

Molina, M. C., Vicente, C., Pedrosa, M. M., Muñiz, E. 1996. Binding of a labelled lectin from de lichen *Xanthoria parietina* ot its own phycobiont and analysis of this enzymatic activity. Phyton, 36: 145-158.

Mosbach, K. 1973. Biosynthesis of lichen substances. En: Ahmadjian, V., Hale, M. E. (Eds.) The Lichens. Academic Press, New York. Pp: 523-546.

Mouilleron, S., Golinelli-Pimpaneau, B. 2007. Conformational changes in ammonia-channeling glutamine amidotransferases. Curr. Opin. Struct. Biol., 17: 653-64.

Nakayama, K., Itagaki, T., Okada, M. 1986. Pigment composition of chlorophyll-protein complexes isolated from the green alga *Bryopsis maxima*. Plant Cell Physiol., 27: 311-317.

Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R., Kim, H. S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D. B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P. S., Farman, M., Fedorova, N., Feldblyum, T. V., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., Garcia, J. L., Garcia, M. J., Goble, A., Goldman, G. H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jimenez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafton, A., Latge, J. P., Li, W., Lord, A., Lu, C., Majoros, W. H., May,

G. S., Miller, B. L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Penalva, M. A., Perteu, M., Price, C., Pritchard, B. L., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M. A., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G. D., Rodriguez de Cordoba, S., Rodriguez-Pena, J. M., Ronning, C. M., Rutter, S., Salzberg, S. L., Sanchez, M., Sanchez-Ferrero, J. C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekai, F., Turner, G., Vazquez de Aldana, C. R., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J. H., Fraser, C., Galagan, J. E., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B., Denning, D. W. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* Nature, 438: 1151-1156.

Oda, Y., Herrmann, J., Gitt, M. A., Turck, C. W., Burlingame, A. L., Barondes, S. H., Leffler, H. 1993. Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain. J. Biol. Chem., 268: 5928-5939.

Ott, S. 1987. Reproductive strategies in lichens. Bibl. Lichenol., 25: 81-93.

Paulsrud, P., Rikkinen, J., Lindblad, P. 2001. Field experiments on cyanobacterial specificity in *Peltigera aphthosa*. New Phytol., 152: 117-123.

Pedrosa, M. M. 1993. Isoformas de arginasa en *Evernia prunastri* L. Ach: Caracterización y Regulación por fenoles. Tesis doctoral. Universidad Complutense, Madrid.

Pedrosa, M. M., Legaz, M. E. 1992. Distribution of lichen phenolics in *Evernia prunastri* thalli and their secretion to the media as a function of the incubation time on L-ornithine or L-arginine. En: Sato, V., Ishida, S., Ishikawa, M. (Eds.) Endocytobiology. Tübingen University Press. Pp: 75-80.

Pedrosa, M. M., Legaz, M. E. 1995. Separation of arginase isoforms by capillary zone electrophoresis and isoelectric focusing in density gradient column. Electrophoresis, 16: 659-669.

Pérez-Urria, E., Vicente, C. 1989. Purification and some properties of a secreted urease from *Evernia prunastri* thallus. J. Plant Physiol., 133: 692-695.

Perozich, J., Hempel, J., Morris, S. M. 1998. Roles of conserved residues in the arginase family. Biochim. Biophys. Acta, 1382: 23-37.

Petersen, S. V., Thiel, S., Jensenius, J. C. 2001. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. Mol. Immunol., 38: 133-149

Petit, P. 1982. Phytolectins from the nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. New Phytol., 91: 705-710.

Petit, P., Lallemand, R., Savoye, D. 1983. Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var. *canina* which binds to the phycobiont cell walls and its use as cytochemical marker *in situ*. *New Phytol.*, 94: 103-110.

Planelles, V., Legaz, M.E. 1987. Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. *Plant Sci.*, 51: 9-16.

Polle, J. E. W., Benemann, J. R., Tanaka, A., Melis, A. 2000. Photosynthetic apparatus organization and function in the wild type and a chlorophyll *b*-less mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. Dependence on carbon source. *Planta*, 211: 335-344

Potty, V.H. 1969. Determination of proteins in the presence of phenols and pectins. *Anal. Biochem.*, 29: 535-539.

Pressey, R. 1984. Tomato α -galactosidases: conversion of human type B erythrocytes to type O. *Phytochemistry*, 23: 55-58.

Rai, A. N. 1988. Nitrogen metabolism. En: Galun, M. (Ed.), *Handbook of Lichenology*. CRC Press, Boca Raton, FL. Vol I. Pp: 201-237.

Rai, A.N., Söderbäck, E., Bergman, B. 2000. Cyanobacterium-plant symbioses. *New Phytol.*, 147: 449-481.

Ramakrishnan, S., Subramanian, S. S. 1966. Amino acids of *Lobaria subsidiosa*, *Umbilicaria postulata*, *Parmelia nepalensis*, *Ramalina sinensis*. *Curr. Sci.*, 35: 124-128.

Reynolds, S. 1963. The use of lead citrate at high pH as electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 200-211.

Richardson, D. H. S., Hill, D. J., Smith, D. C. 1968. Lichen Physiology. XI. The role of the alga in determining the pattern of carbohydrate movements between lichen symbionts. *New Phytol.*, 67: 469-486.

Rikkinen, J. 2002. Cyanolichens: an evolutionary overview. En: Rai, A. N., Bergman, B., Rasmussen, U. (Eds.), *Cyanobacteria in Symbiosis*. Kluwe Academic Publ., Amsterdam. Pp: 31-72.

Rodríguez, M., Vicente, C. 1991. Water status and urease secretion from two ecotypes of *Xanthoria parietina*. *Symbiosis*, 11: 255-262.

Rundel, P.W. 1978. The ecological role of secondary lichen substances. *Biochem. System. Ecol.*, 6: 157-170.

Saikawa, M. 1982. An electron microscopy study of *Meia coniospora*, an endozoic nematophagous hyphomycete. *Can. J. Bot.* 60: 2019-2023.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Scherrer, S., De Vries, O. M. H., Dudler, R., Wessels, J. G. H., Honegger, R. 2000. Interfacial self-assembly of fungal hydrophobins of the lichen-forming ascomycetes *Xanthoria parietina* and *X. ectaneoides*. *Fungal Gen. Biol.*, 30: 81-93.

Shanon, L., Hankins, C.N. 1981. En: Loewus, F. A., Ryan, C. A., (Eds.), Enzymatic properties of phytohaemagglutinins in the phytochemistry of cell recognition and cell surface interactions. Plenum Press, New York. Pp: 93-114.

Shapiro, I. A. 1977. Urease activity in lichens. *Fisiol. Rast.*, 24: 1135-1139.

Shibuya, T., Kobayashi, H., Yoshida, S., Kaneko, S., Park, G. G., Kusakabe, I. 1999. Purification and characterization of recombinant *Mortierella vinacea* alpha-galactosidases I and II expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 1096-1099.

Shoham, M., Yonath, A., Sussmann, J.L., Moul, J., Traub, W., Kalb, A.J. 1979. Crystal structure of demetallized concanavalin A: the metal binding region. *J. Mol. Biol.*, 131: 137-155.

Singh, J., Kamboj, S. S., Sandhu, R. S., Shangarg, S., Kaur, K. 1993. Purification and characterization of a tuber lectin from *Alocasia indica*. *Phytochemistry*, 33: 979-983.

Slocum, R. D., Ahmadjian, V., Hildreth, K. C. 1980. Zoosporogenesis in *Trebouxia gelatinosa*: potential for zoospore release and implications for the lichen association. *Lichenologist*, 12: 173-187.

Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B. J., Kijne, J. W. 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol Microbiol.*, 6: 2897-2903.

Smith, D. C., Douglas, A. 1987. En: Arnold, E. (Ed.). The Biology of Symbiosis. London. Pp: 1-302.

Spurr, A. R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 31-43.

Standard Methods. 1955. American Public Health Association Inc. New York. Pp: 390.

Stillmark, H. 1888. Über Rizin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* und einigen anderen Euphorbiaceen. Inaug. Dissert., Dorpat.

Sumrada, R. A., Cooper, T. G. 1984. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* arginase gene (Car1) and its transcription under various physiological conditions. J. Bacteriol., 160: 1078-1087.

Thiel, S. 1992. Mannan-binding protein, a complement activating animal lectin. Immunopharmacol. 24: 91-98.

Tiburcio, A. F., Campos, J. L., Figueras, X., Besford, R. T. 1993. Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. Plant Growth Reg., 12: 331- 340.

Tiburcio, A. F., Masdéu, M. A., Dumortier, F. M., Galston, A. W. 1986. Polyamine metabolism and osmotic stress. I. Relation to protoplast viability. Plant. Physiol., 82: 369-374.

Todd, C. D., Gifford, D. J. 2003. Loblolly pine arginase responds to arginine in vitro. Planta, 217: 610-6155.

Toyoda, K., Miki, K., Ichinose, Y., Yamada, T., Shiraishi, T. 1995. Plant lectins induce the production of a phytoalexin in *Pisum sativum*. Plant Cell Physiol., 36: 798-807.

Trembley, M. L., Ringli, C., Honegger, R. 2002. Morphological and molecular analysis of early stages in the resynthesis of the lichen *Baeomyces rufus*. Mycol. Res., 106: 768-776.

Tulsiani, D. R. P., Skudlarek, M. D., Orgebin-Christ, M. C. 1995. Purification and characterization of two forms of β -D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoproteins. Biochem. J., 305: 41-50.

Van Huffel, C., Dubois, E., Messenguy, F. 1994. Cloning and sequencing of *Schizosaccharomyces pombe* car1 gene encoding arginase. Expression of the arginine anabolic and catabolic genes in response to arginine and related metabolites. Yeast, 10: 923-933.

Vartia, K. O. 1973. Antibiotics in lichens. En: Ahmadjian, V., Hale, M. E. (Eds). The Lichens. Academic Press, New York. Pp: 547-561.

Vavasseur, A., Gautier, H., Thibaud, M. C., Lascève, G. 1991. Effects of usnic acid on the oxygen exchange properties of mesophyll cell protoplasts from *Commelina communis*. J. Plant Physiol., 139: 90-94.

Viard, B., Al Mahmood, S., Streiblova, E., Bonaly, R. 1993. Alternate interactions of the D-galactose-specific yeast lectin Kb-CWL J with sensitive yeast strains. FEMS Microbiol. Lett., 107: 17-24.

Vicente, C. 1993. Evolutionary convergence of light-perceiving systems. Vision-like cascade started by phytochrome in lichens. Endocyt. Cell Res., 9: 255-267.

Vicente, C., Legaz, M. E. 1981. Purification and properties of L-arginine decarboxylase of *Evernia prunastri*. Plant Cell Physiol., 22: 1119-1123.

Vicente, C., Legaz, M. E. 1982. Purification and properties of agmatine amidino hydrolase of *Evernia prunastri*. Physiol. Plant, 55: 335-339.

Vicente, C., Legaz, M. E. 1983. Regulation of urea production in *Evernia prunastri*. effects of L-arginine metabolites. Z. Pflanzenphysiol., 111: 123-131.

Vicente, C., Legaz, M. E. 1988. Lichen enzymology. En: Galun, M. (Ed.), Handbook of Lichenology, CRC Press, Boca Raton, FL. vol. 1. Pp: 239-284,

Vicente, C., Legaz, M. E. 2000. Fisiología de la simbiosis: el concepto de endohábitat. En: Fisiología Vegetal Ambiental. Síntesis. Pp: 267-281.

Vicente, C., Nieto, J. M., Legaz, M. E. 1983. Induction of urease by urea analogues in *Evernia prunastri* thallus. Physiol. Plant, 58: 325-330.

Vicente, C., Vicente-Manzanares, M., Sacristán, M., Vivas, M., Legaz, M. E. 2008. Molecular recognition by lichen lectins, as a primitive mechanism to discriminate between compatible and incompatible algal partners. En: Legaz, M. E., Vicente, C. (Eds.) Biochemical Responses of Plants to Invaders. Research Signpost, Trivandrum. Pp: 13-32

Vivas, M. P., Sacristán, M., Legaz, M. E., Vicente, C. 2009. The model of cell recognition in phycolichens through a fungal lectin that binds to an algal ligand can be expanded to cyanolichens. Enviado a: Plant Biology.

Wagemaker, M.J., Welboren, W., Van der Drift, C., Jetten, M. S., Van Griensven, L. J., Op den Camp, H. J. 2005. The ornithine cycle enzyme arginase from *Agaricus bisporus* and its role in urea accumulation in fruit bodies. Biochim. Biophys. Acta, 1681: 107-115.

Walters, R. R. 1985. Ligands for immobilization, En: Dean, P. D. G., Johnson, W. S., Middle, F. A., (Eds.). Affinity Chromatography, a practical approach. IRL Press, Oxford. Pp. 114-166.

Wedin, M., Theler, A., Gargas, A. 1998. Phylogenetic relationships of *Sphaerophoraceae* (Ascomycetes) inferred from SSU rDNA sequences. Plant Syst. Evol., 209: 75-83.

Whittaker, J. W. 2005. The radical chemistry of galactose oxidase. Arch. Biochem. Biophys., 433: 227-239.

Xavier Filho, L., Mendes, C. G., Vasconcelos, C. A. F. 1971. Fitohemaglutinina em alguns criptogamos. Est. Pesq., B2: 1-8.

Xavier Filho, L., Mendes, C. G., Vasconcelos, C. A. F., Costa, A. C. 1980. Fitohemagglutina (lectins) em basidioliquens. Bol. Soc. Brot., 4: 41-46.

Yamazaki, J., Kozu, A., Fukmaga, Y. 2006. Characterization of chlorophyll-protein complexes isolated from two marine green algae, *Bryopsis maxima* and *Ulva pertusa*, growing in the intertidal zone. Photosynth. Res., 89: 19-25.

Yoshida, M., Kato, S., Oguri, S., Wagata, Y. 1994. Purification and properties of lectins from a mushroom, *Pleurotus cornucopiae*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 58: 498-501.

Zalkin, H. 1973. Anthranilate synthase. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 38: 1-39.

Zalkin, H. 1993. The amidotransferases. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 66: 203-309.

Zhu-Salzman, K., Hammen, P. K., Salzman, R. A., Koiwa, H., Bressan, R. A., Murdock, L. L., Hasegawa, P. M. 2002. Calcium modulates protease resistance and carbohydrate binding of a plant defense legume lectin, *Griffonia simplicifolia* lectin II (GSII). Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 132: 327-334.